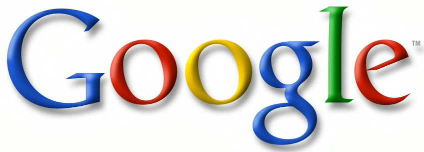
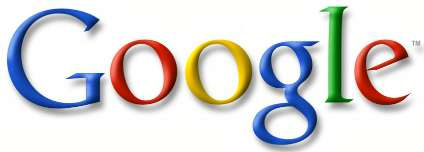




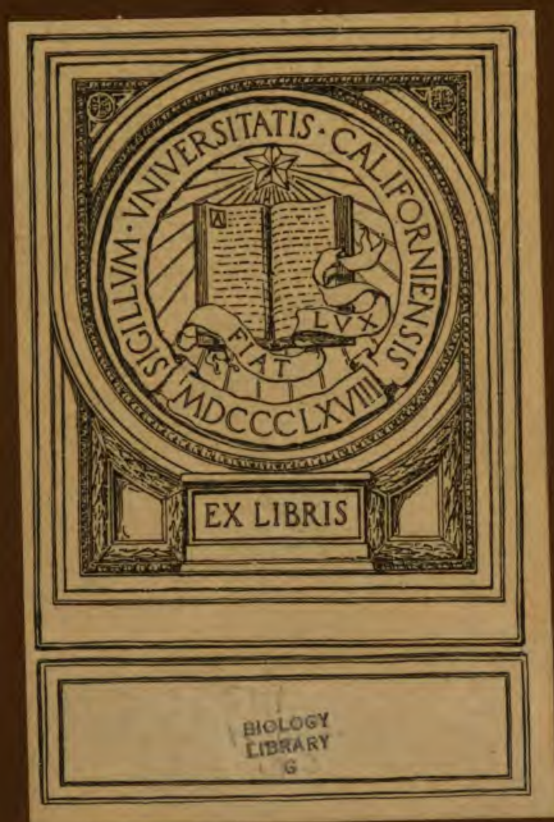


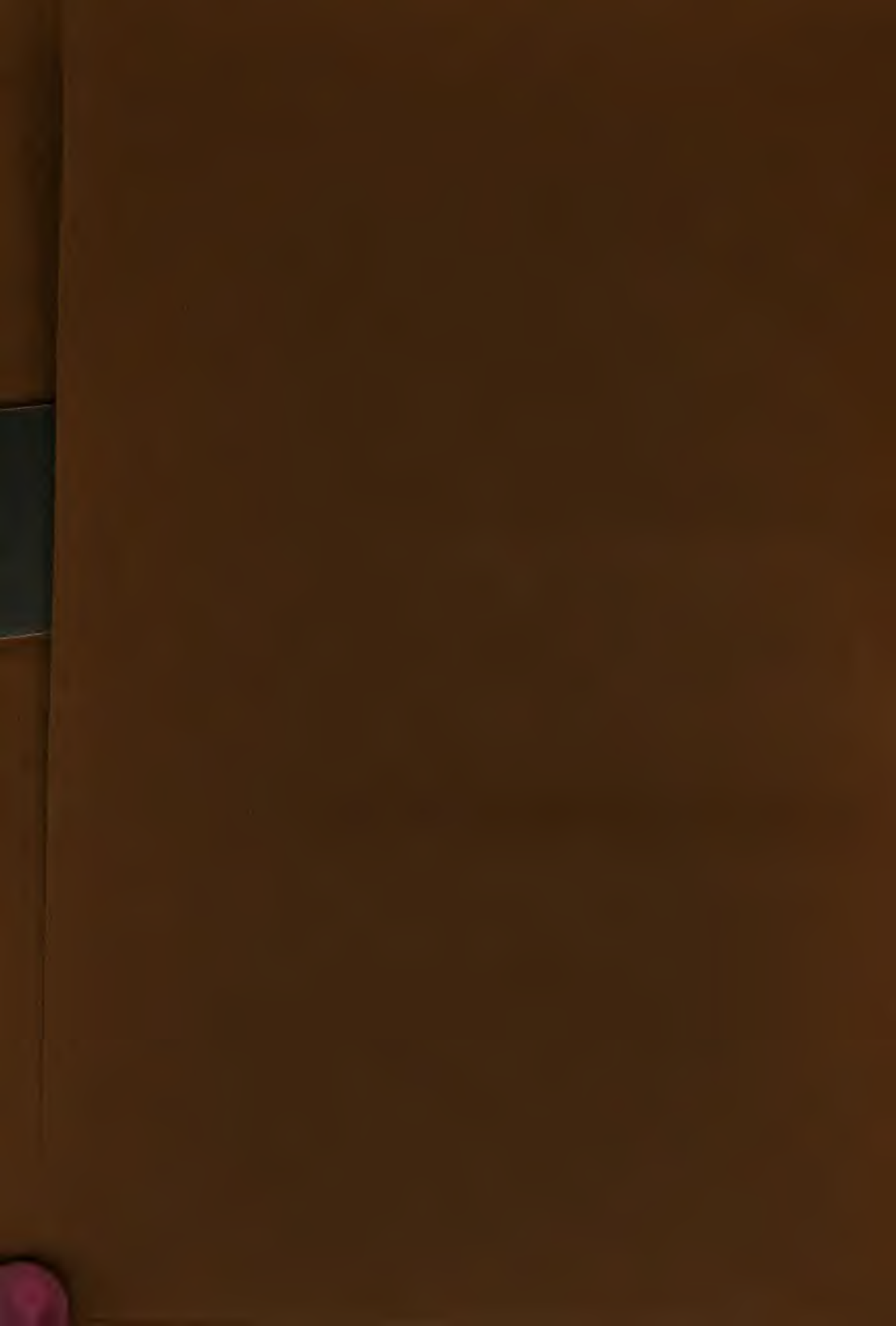
KULTUR DER MIKROORGANISMEN

VON

ERNST KÜSTER

B. G. TEUBNER LEIPZIG-BERLIN


SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
LVX
FIAT
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS



ANLEITUNG ZUR KULTUR DER MIKROORGANISMEN

FÜR DEN GEBRAUCH IN
ZOOLOGISCHEN, BOTANISCHEN, MEDIZINISCHEN
UND LANDWIRTSCHAFTLICHEN LABORATORIEN

VON

DR. ERNST KÜSTER
PROFESSOR DER BOTANIK IN BONN

ZWEITE VERMEHRTE UND
VERBESSERTE AUFLAGE

MIT 25 ABBILDUNGEN IM TEXT



LEIPZIG UND BERLIN
DRUCK UND VERLAG VON B. G. TEUBNER
1913

GEORG KLEBS

ZUGEEIGNET

Vorwort zur ersten Auflage.

Während meiner langjährigen Assistentendienstzeit im Botanischen Institut zu Halle a. S. gehörte es zu meinen Obliegenheiten, Anfänger und vorgeschrittene Studierende zur künstlichen Züchtung verschiedenartiger Mikroorganismen anzuleiten. Durch die Bedürfnisse des Unterrichts wurde ich bald dazu geführt, eine Sammlung von Rezepten anzulegen, die ich mit dem vorliegenden Buch in erweiterter Form der Öffentlichkeit zu übergeben mir erlaube. Da bisher die biologische Literatur kein Werk besaß, das für alle Gruppen der Mikroorganismen die wichtigsten Kulturmethoden angibt, schien es mir nicht überflüssig, meine Notizen zu veröffentlichen.

Das vorliegende Werkchen ist in erster Linie für Anfänger bestimmt und immer für die Bedürfnisse derer berechnet, welche vor allem zum Zweck wissenschaftlicher Forschungen die Methoden zur Züchtung der Mikroorganismen erlernen möchten. Daher habe ich mich auch bemüht, durch kurze Darlegungen physiologischen Inhalts das wissenschaftliche Verständnis für die Kulturmethoden und für den Wert der Mikrobenzüchtung überhaupt vorzubereiten. Hier und da wird wohl auch der Vorgeschrittene noch Auskunft über diese oder jene Frage finden.

Da ich nur einen Leitfaden und kein Handbuch geben wollte, habe ich namentlich im Speziellen Teil nur eine beschränkte Zahl von Beispielen erläutern können; ganz besonders kurz habe ich die technisch wichtigen und pathogenen Mikroben behandelt, für die wir schon eine ausgedehnte Lehrbuchliteratur besitzen. Um den einen Leitfaden zukommenden Umfang nicht allzu sehr zu überschreiten, habe ich mich auch bei Aufzählung der wichtigsten Literatur sehr beschränken müssen; diejenigen, welche tiefer in die Materie eindringen wollen, werden im allgemeinen in den von mir zitierten Arbeiten weitere Literaturnachweise finden.

Da vielleicht diejenigen Leser, welche mit der Verteilung des Stoffes im vorliegenden Buch noch nicht vertraut sind, im Speziellen Teil Auskunft über irgendwelche Fragen suchen, die schon im Allgemeinen Teil behandelt worden sind — oder umgekehrt —, habe ich das Sachregister recht ausführlich ausgearbeitet und hoffe, alle in dem Buch vereinigten Angaben dadurch leicht zugänglich gemacht zu haben.

Küster.

Halle a. S., Botanisches Institut, Mai 1907.

Vorwort zur zweiten Auflage.

Die Anordnung des Stoffes ist in der neuen Auflage dieselbe geblieben wie in der ersten; im einzelnen sind aber sehr zahlreiche Veränderungen und Ergänzungen des Inhalts notwendig geworden. Erfahrungen, die ich in den letzten Jahren beim Unterricht und bei eigenen Arbeiten gesammelt habe, waren zu berücksichtigen und den in der mikrobiologischen Literatur niedergelegten Forschungsergebnissen nach Möglichkeit Rechnung zu tragen, namentlich das die Pilze behandelnde Kapitel hat viele Veränderungen erfahren und Zusätze bekommen. Um Raum für die notwendig gewordenen Zusätze zu gewinnen, habe ich die früher gegebenen Literaturnachweise, manche physiologische Exkurse kürzen, die Hinweise auf neue Arbeiten möglichst knapp fassen und manche minder wichtigen Rezepte fortlassen müssen. Trotzdem ist die neue Auflage ungefähr einen Bogen stärker geworden als die erste. — Die Zahl der Abbildungen habe ich um ein Geringes vermehrt.

Arbeiten, die mir erst während des Druckes zugänglich wurden, habe ich in den Fußnoten [in Klammern] genannt; einige weitere habe ich noch in den „Nachträgen" am Schluß des Buches angeführt.

Küster.

Bonn, September 1912.

Inhaltsverzeichnis.

Einleitung.

So wie sich Organismen von makroskopischen Größenverhältnissen von ihren natürlichen Standorten trennen und zum Zwecke wissenschaftlicher Beobachtung künstlich kultivieren lassen, können auch Mikroorganismen jeder Art im Laboratorium fortgezüchtet werden unter Bedingungen, die der Forscher den natürlichen Standorten der Lebewesen anpaßt und für die Zwecke seiner Forschungen willkürlich variiert. In zoologischen, botanischen und bakteriologischen Laboratorien, in landwirtschaftlichen, hygienischen und gärungsphysiologischen Instituten beschäftigt man sich mit der „Kultur" der Mikroorganismen, und viele Forscher haben sich an dem Problem versucht, die Züchtungsmethoden immer mehr zu vervollkommnen. Die Lehre von der künstlichen Kultur der Mikroorganismen ist fast schon zu einer eigenen Hilfswissenschaft der Biologie herangewachsen.

Wozu werden nun in den Laboratorien Kulturen angelegt, und zu welchen Zwecken bedient sich ihrer der Forscher? Es gibt keine Disziplin unter den biologischen Wissenschaften, welche nicht schon aus der künstlichen Kultur der Mikroorganismen Nutzen gezogen hätte, und für viele Forschungsrichtungen ist die Verwendung von Kulturen längst unentbehrlich geworden. Vor allem ist oft genug nur auf dem Wege der künstlichen Züchtung eine gründliche Kenntnis von dem betreffenden Organismus zu gewinnen. In erster Linie müssen wir die formalen Eigentümlichkeiten eines uns interessierenden Lebewesens kennen lernen, und wir machen uns mit seiner Morphologie und Entwicklungsgeschichte bekannt, indem wir uns eine ausreichende Anzahl von Individuen vorrätig halten, sie in regelmäßigen Zeitabständen auf den Fortgang ihrer Entwicklung prüfen oder gar unter dem Mikroskop in ununterbrochener Beobachtung ihre Veränderungen studieren. Die Kultur soll uns dabei aber nicht bloß als bequem zugänglicher Standort der Organismen dienen, sondern uns namentlich vor der Verwechslung und Vermengung von Formen bewahren, die verschiedenen Spezies angehören. Diese Erwägung führt uns zu der Forderung, die Kulturen der Mikroorganismen als Reinkulturen anzulegen, d. h. als solche, welche eben nur den uns interessierenden Organismus und keinen anderen neben ihm enthalten. Die Kleinheit der Lebewesen und nicht selten auch die äußere Ähnlichkeit verschiedener Arten erschweren diese Aufgabe allerdings und machen fast immer besondere Methoden zur Trennung der Lebewesen voneinander notwendig. Wird uns die Beobachtung des in Kultur gehaltenen

Organismus mit manchen Phasen bekannt machen, die ohne seine künstliche Züchtung leicht übersehen oder in ihrer Bedeutung für den Entwicklungsgang des Lebewesens vielleicht verkannt worden wären, so macht es andrerseits die Reinkultur unmöglich, allzuviele Gestalten im Entwicklungsgang eines Organismus unterzubringen und ihm eine Vielgestaltigkeit zuzuschreiben, die ihm gar nicht zukommt. Für viele Mikroorganismen und ganze Gruppen von ihnen hat man sich erst in jüngster Zeit durch gewissenhaft angelegte Reinkulturen über ihren vermeintlichen Pleomorphismus aufklären lassen, und die Systematik der niederen Organismen verdankt der künstlichen Züchtung ihrer Studienobjekte manche wertvolle Berichtigung. Kulturen, welche mehr als eine Form enthalten, können gerade bei entwicklungsgeschichtlichen Studien leicht zu groben Täuschungen führen und sind daher zu meiden.

Es genügt aber zur wissenschaftlichen Erkenntnis der Organismen nicht, ihre Formen kennen zu lernen und zu beschreiben, wir müssen die Gestaltungsprozesse, die wir an ihnen sich abspielen sehen, auch kausal zu ergründen suchen: für die Probleme der Entwicklungsmechanik werden die Mikroorganismen dadurch, daß man sie in künstlichen Kulturen, d. h. unter dem Einfluß leicht kontrollierbarer und konstanter Bedingungen halten kann, zu einem hervorragend günstigen Versuchsmaterial. Wie steht es mit den verschiedenen Entwicklungsphasen der Protisten, der vielzelligen Algen und Pilze usw.? Folgen sie einander aus „innerer" Notwendigkeit, wie etwa der Zeiger der Uhr unbedingt der I sich nähert, sobald er die XII verläßt, oder bestimmen äußere Faktoren die Reihenfolge der Gestaltungsprozesse? und welcher Art sind etwa die Faktoren, welche bestimmte Entwicklungsphasen herbeiführen? Es ist bedeutungsvoll genug, daß wir diese wichtigen Fragen und viele andere im allgemeinen nur für diejenigen Organismen mit endgültiger Gewißheit beantworten können, die sich „kultivieren" lassen. Für viele Algen und Pilze hat sich namentlich hinsichtlich ihrer Fortpflanzung die unbedingte Abhängigkeit bestimmter Phasen und bestimmter Organbildungsvorgänge von äußeren Bedingungen nachweisen lassen. Es gelingt in künstlichen Kulturen durch bestimmte Variation der Lebensbedingungen, die in letzter Instanz immer auf Ernährungsfragen hinauslaufen, an dem Organismus nach Belieben bald diese, bald jene Gestaltungsprozesse hervorzurufen, und es wird uns klar, warum in der Natur so oft nur zu verschiedenen Jahreszeiten verschiedene Stadien der betreffenden Algen usw. zugänglich werden; hat man gelernt, die Kulturbedingungen geschickt zu variieren, so kann man an seinen Untersuchungsobjekten unabhängig von Saison und Witterung alle Entwicklungsphasen hervorrufen, — denn abgesehen vom weißen Tageslicht lassen sich alle wirksamen Faktoren künstlich schaffen und beliebig variieren und kombinieren.

Derselbe gesetzmäßige Zusammenhang wie zwischen den als normal anerkannten Formen und bestimmten äußeren Bedingungen besteht selbstver-

ständlich auch zwischen diesen und den abnormalen Gestaltungsvorgängen: für die Fragen der allgemeinen Pathologie der Zelle werden sich zweifellos durch gründliches Studium der kultivierbaren Mikroorganismen noch manche wertvolle Aufschlüsse erzielen lassen; vieles ist auch auf diesem Gebiete schon jetzt geklärt.

Was leistet ferner die künstliche Kultur der Organismen für die Kenntnis von ihrer Physiologie? Die physiologischen Erfahrungen, die an Bakterien, Pilzen u. a. bei ihrer künstlichen Züchtung gesammelt worden sind, gehören zu den glänzendsten Resultaten der Kulturtechnik und nicht minder zu den hervorragendsten Ergebnissen der modernen Physiologie überhaupt. Die Lehre von den anaëroben Organismen, von der Assimilation des elementaren Stickstoffs, von der Verarbeitung der Kohlensäure ohne Chlorophyll, der Nitrifikation und Denitrifikation, den verschiedenartigen Gärungen, die Beobachtungen über Elektion der Nährstoffe, über Adaption an Gifte, Narkotika, osmotisch wirksame Lösungen usw., viele Aufschlüsse über Atmung, Chlorophyllbildung, Assimilation, über Chemotaxis und andere taktische Erscheinungen, über die Notwendigkeit mineralischer Bestandteile für organisches Wachstum, ferner Aufklärung über die Wirkung der sog. pathogenen Mikroorganismen auf andere Lebewesen, Aufschluß über Vorkommen und Verbreitung der Bakterien, vieler Pilze usw., die Widerlegung der Lehre von der Urzeugung und vieles andere verdanken wir direkt oder indirekt der Möglichkeit, Mikroorganismen künstlich zu kultivieren. Besondere Dienste leisten auch hierbei wiederum die Reinkulturen. — Ich kann hier nicht näher auf alle angeführten Punkte eingehen, deren Bedeutung ja aus den allgemeinen Lehrbüchern der Physiologie und der Botanik ersichtlich ist; weiter unten wird von der Ernährungs- und Atmungsphysiologie der Mikroorganismen die Rede sein. Die Mannigfaltigkeit ihrer Ernährungsansprüche und der vielen Unterschiede in den Stoffwechselprodukten der Lebewesen und manche andere Ergebnisse der physiologischen Forschung haben ihrerseits die Systematik der niederen Organismen gefördert, da in Ermangelung leicht wahrnehmbarer morphologischer Merkmale oft physiologische Kennzeichen für die Artbeschreibung herangezogen werden mußten. Es ist selbstverständlich, daß unsere Kulturen uns nur dann ein Urteil über das chemische Verhalten irgendwelcher Lebewesen gestatten, wenn Reinkulturen vorliegen.

Zweifellos werden auch für die Abstammungslehre, für die Lehre von der Variabilität der Organismen, Rassenbildung, Mutation und deren Ursachen die künstlichen Kulturen vieles zu leisten vermögen. Schon jetzt läßt sich mit Bestimmtheit sagen, daß für manche Fragen der experimentellen Vererbungslehre gerade die Mikroorganismen, welche in wenigen Tagen viele Generationen erzeugen, ein außerordentlich günstiges Forschungsmaterial abgeben. Die Kultur der Bakterien, Algen und Pilze hat es außer Zweifel gestellt, daß durch Züchtung unter bestimmten Bedingungen die in einer Kultur vereinigten Organismen langsam fortschreitend sich verändern, neue

Eigenschaften annehmen, alte verlieren können, und daß ferner in künstlichen Kulturen neben typischen Exemplaren — unvermittelt oder in langsamem Übergang — Varianten und Rassen auftreten können — ähnlich wie wir es für höhere Pflanzen kennen. —

Haben wir einen Mikroorganismus mit Hilfe der Reinkulturen nach allen Richtungen hin gut erforscht, so zieht die angewandte Biologie die Nutzanwendungen: wir benutzen die Einsicht in die Lebensbedingungen der Bakterien, Hefen, Pilze usw. dazu, um die dem Menschen schädlichen Formen zu bekämpfen und die ihm nützlichen auszubreiten und zu vermehren; jedermann weiß, was die Kenntnis der pathogenen Bakterien für die moderne Hygiene, für die Kunst der Diagnose und die Regeln der Therapie bedeutet, und welchen Aufschwung z. B. die Gärungsindustrien durch die Erforschung der verschiedenen Gärungserreger erfahren haben.

Und was bleibt nach so vielseitigen wissenschaftlichen Eroberungen noch für die Zukunft zu tun übrig? So viel auch schon getan ist, bleibt doch noch das meiste zu tun übrig. Die Erforschung der morphologischen, entwicklungsgeschichtlichen und physiologischen Eigentümlichkeiten der Organismen ist bisher erst für eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Arten endgültig durchgeführt. Für große Gruppen von Protisten liegen erst vereinzelte, womöglich noch unsichere Angaben vor, und über viele Familien läßt sich vorläufig nur das sagen, daß es bisher überhaupt noch nicht gelungen ist, ihre Vertreter auf künstlichem Nährboden rein zu züchten. Die Physiologie insbesondere stellt mit jedem Tage neue Aufgaben. Abgesehen davon, daß viele der oben angeführten Punkte nur unvollkommen aufgeklärt sind und weitere Forschung notwendig machen, werden wir noch auf vielen neuen Gebieten Erfolge ernten dürfen: die Bearbeitung der Frage nach der Sexualität niederer tierischer und pflanzlicher Organismen ist durch die Forschungen der letzten Jahre auf vielversprechende Bahnen gewiesen worden. Die Aufgabe, experimentell die allgemeinen Fragen der Kern- und Zytoplasmaphysiologie zu behandeln, hat bisher leider wenig Bearbeiter gefunden; weiterhin steht die Ermittlung neuer biologischer Gruppen und ihres Stoffwechsels, die Mikrobiologie des Meeres, der Erde, des Moores, des Waldes, das Studium der Infektionskrankheiten, deren Erreger noch unbekannt oder unvollkommen erforscht sind, und vieles andere auf dem Programm; namentlich aber legen die Errungenschaften der physikalischen Chemie eine Fülle von Fragen nahe, deren Beantwortung mit Hilfe der Organismenkulturen möglich werden dürfte. Für diese und viele andere Fragen werden die bisher geübten Methoden der Kultur gewiß noch vielfach ausreichen. Dabei dürfen wir aber nicht stehen bleiben: mit neuen Methoden eröffnen sich uns neue Arbeitsgebiete und erschließen sich neue Erfolge. Wir werden versuchen müssen, die Kulturbedingungen der Mikroorganismen den Lebensbedingungen, unter deren Einfluß sie an ihren natürlichen Standorten sich entwickeln, immer ähnlicher zu machen, — auch insofern als in der freien Natur fast niemals „Reinkulturen“

eines Organismus vorliegen, sondern immer mehrere, ja sogar viele verschiedene Arten nebeneinander leben und sich gegenseitig in bestimmter Weise, die aufzuklären ein weiteres Ziel der Forschung sein wird, beeinflussen. Haben die Reinkulturen über eine bestimmte Spezies uns alles Erforderliche erkennen lassen, so werden wir mit Hilfe planmäßig angelegter Mischkulturen unsere Kenntnis von den Mikroben zu vertiefen haben.

Ein schönes Ziel bleibt es ferner für künftige Untersuchungen, die Methoden, die bei der Erforschung der Protisten uns gefördert haben, auf die Elementarteile der Metazoen und Metaphyten anzuwenden. Jede Zelle eines hoch komplizierten Tier- oder Pflanzengebildes ist in ihrer Ernährung abhängig von den Wirkungen ihrer lebendigen Nachbarn: wenn es erst einmal gelingen wird, isolierte Zellen pflanzlicher Vegetationspunkte oder Embryonen, Leukocyten, isolierte Bindegewebszellen, Karzinomzellen usw. künstlich zu kultivieren, werden wir zweifellos auf viele Fragen der Zellenlehre und Physiologie und für viele Probleme, die hinter Wachstumserscheinungen, Regeneration, Sexualität und physiologischem Tod sich uns verbergen, Antworten finden. Selbst für Fragen der Mikrokristallographie möchte ich die Anwendung mikrobiologischer Methoden für aussichtsreich halten.

Jede wissenschaftliche Aufgabe, die mit Hilfe der Kultur von Mikroorganismen gelöst werden soll, bedarf bestimmter Methoden, für deren Auswahl und deren Ausführung im einzelnen keine schematischen Regeln aufgestellt werden können. Das vorliegende Buch gibt zwar einige Rezepte und führt einige Literatur an, will aber durch beides nur dem Anfänger die Wege weisen, die zur Lösung seiner Aufgabe führen. Hierbei möchte aber der Verfasser namentlich zum wissenschaftlichen Verständnis der Kulturmethoden anleiten und für die mit ihnen erreichbaren Resultate interessieren, damit später der Vorgeschrittene über die jeweils erforderlichen Kulturmaßnahmen selbständig nachzudenken imstande sei.

A. Allgemeiner Teil.

Im Allgemeinen Teil wird vor allem festzustellen sein, was für Substrate als Nährmedien sich für die Mikroorganismen bewährt haben; es wird eine Auswahl dieser „Nährböden“, ihre Herstellung und ihre Wirkung auf die Organismen zu schildern sein. Weiterhin: in welchen Behältern bringen wir die Nährböden am besten unter? wie bringen wir die Organismen in sie hinein? wie sind die in der Einleitung als wichtig genannten Reinkulturen herzustellen? Wenn wir über diese und einige andere Fragen uns Rechenschaft gegeben haben werden, mag im Speziellen Teil das unterschiedliche Verhalten der Mikroorganismengruppen seine Würdigung finden.

I. Wasser und Glas.

Wir beginnen unsere Erörterungen füglich mit dem Wasser, der Voraussetzung aller organischen Entwicklung. Bei der Kultur der Mikroorganismen bedienen wir uns unausgesetzt des Wassers, indem wir entweder reines Wasser unmittelbar auf die Organismen wirken lassen oder es als Lösungsmedium für Stoffe der verschiedensten Art verwenden. Von den Lösungen wird später zu sprechen sein; an dieser Stelle soll zunächst nur von dem „reinen Wasser“ die Rede sein, dessen Betrachtung sich von der des Glases nicht trennen läßt; denn Glasgefäße als unentbehrliche Behälter von Wasser und wässerigen Lösungen beeinflussen letztere unausgesetzt durch die allmähliche Lösung der im Glas enthaltenen Substanzen.

Für den Bedarf der Laboratorien steht Wasser in den verschiedensten Abstufungen von Reinheit zur Verfügung; zwischen dem Leitungs- und Quellwasser einerseits und dem reinsten Leitfähigkeitswasser vermittelt das „destillierte Wasser“ gewöhnlicher Art. Welche von diesen Formen zu bevorzugen oder als ausreichend anzuerkennen ist, hängt von den wechselnden Aufgaben und Gesichtspunkten des Forschers ab.

Daß Leitungs- und Quellwasser und überhaupt alle natürlichen aus Bächen, Sümpfen, Flüssen, Seen und Meeren stammenden Wässer mehr oder minder konzentrierte Lösungen von verschiedenen Salzen usw. darstellen, ist eine allbekannte Tatsache.

Es ist klar, daß die Stoffe, welche auch in „gutem“, d. h. nicht allzu kalk- oder eisenreichem oder gar manganhaltigem Leitungswasser vorhanden sind, dieses für viele subtile physiologische — insbesondere ernährungsphysiologische — Untersuchungen oder für solche, welche Fragen der physikalischen Chemie nachgehen, von vornherein ausschließen. Andrerseits werden die im

Leitungswasser gelösten Stoffe sehr wohl auf manche vom Kultivator angestrebten Wachstumserscheinungen oder dergleichen anregend wirken und die Anwendung von Leitungswasser daher empfehlenswert machen können.

Das destillierte Wasser, wie es in den Laboratorien üblicherweise zur Verfügung steht, darf vom Chemiker in vielen Fällen anstandslos als Ausgangsmaterial und Lösungsmedium benutzt werden; der Physiologe dagegen wird es nicht ohne Vorsicht anwenden dürfen. Zweierlei ist zu bedenken: zunächst kehren im destillierten Wasser leicht manche der Stoffe, die im gewöhnlichen Leitungswasser vorliegen, wieder — wenn auch in außerordentlich viel schwächerer Konzentration[1]); die Anspruchslosigkeit mancher Organismen geht aber so weit, daß selbst der geringe Gehalt des destillierten Wassers an Mineralsalzen ihnen eine langsame Entwicklung möglich macht. Das beweist z. B. der grüne Algenanflug, der sich in Gefäßen mit destilliertem Wasser leicht bildet. Zweitens aber — und dieser Punkt ist besonders wichtig — kommen gerade beim Destillationsprozeß leicht fremde Stoffe ins Wasser hinein; die Berührung mit den üblichen kupfernen Kesseln oder Röhren genügt, um das Wasser giftig und für viele Versuche untauglich zu machen.[2]) Berührung des Wassers mit Metallen ist überhaupt für den Physiologen mißlich, und auch gegen Leitungswasser, das langsam durch metallene Röhren geflossen oder in solchen gestanden hat, wird man oft mißtrauisch sein müssen; namentlich vor dem Kupfer ist zu warnen, aber selbst Platin ist nicht unverdächtig.[3]) Zwar läßt sich metallhaltiges Wasser entgiften; Nägeli gibt an, daß z. B. Zusatz von Stärke, Ruß und anderen physiologisch harmlosen Stoffen die Wirkung geringer Kupfermengen aufhebe[4]), und Herbst (a. a. O.) konnte Kupferspuren durch Magnesiumkarbonat, Kalziumphosphat usw. fällen. Es wird aber meist vorzuziehen und in vielen Fällen notwendig sein, Wasser herzustellen, das von vornherein metallfrei oder mindestens kupferfrei ist. Das ist aber nur zu erreichen, wenn man beim Destillationsvorgang alle metallenen, insbesondere alle kupfernen Gerätschaften vermeidet. Natürlich wäre alsdann in erster Linie an Glasgefäße und Glasröhren zu denken.

Hier ist nun einer weiteren Schwierigkeit zu gedenken. Nicht nur beim Kochen, sondern auch schon bei dauernder Berührung gewöhnlichen Glases mit kaltem Wasser werden, wie schon Lavoisier bekannt war, aus dem Glase

1) Vgl. Stas, J. S., Untersuchungen über die Gesetze der chemischen Proportionen usw., Übersetzung von Aronstein, Leipzig 1867, 110; Molisch, Über d. Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen. Jena (G. Fischer) 1892, 81 u. 106.

2) Vgl. z. B. Herbst, C., Über zwei Fehlerquellen beim Nachweis der Unentbehrlichkeit von Phosphor und Eisen für die Entwicklung der Seeigellarven (Arch. f. Entwicklungsmechanik 1898, **7**, 486).

3) Molisch, Ernährung der Algen, Süßwasseralgen (I. Abhandlung; Sitzungsber. d. Akad. Wiss. Wien, math.-naturwiss. Kl., 1895, **104**, I, 783, 789).

4) Üb. oligodynam. Erschein. in lebenden Zellen (Denkschrift der Schweizer Naturf. Ges. 1893).

mancherlei Stoffe herausgelöst, die bei ernährungsphysiologischen Versuchen das Resultat unklar machen können. Kalium, Natrium und Magnesium kommen dabei neben Silizium in erster Linie in Betracht. Wir verdanken MOLISCH[1]) eine einfache Methode, sich von dem störenden Einfluß des Glases unabhängig zu machen: man legt die Glasgefäße mit einer dünnen Schicht Paraffin aus — MOLISCH nimmt solches von hohem Schmelzpunkt (74°—78°). Verzichtet man auf sehr gleichmäßige Paraffinauskleidung, so kann man sich in der kürzesten Zeit eine große Anzahl von Kolben oder Dosen mit Paraffin ausgießen. Die Glasgefäße müssen bei der Paraffinierung völlig trocken sein, da sich sonst die Paraffinhaut blasenartig abhebt. Daß das Wasser des Kulturmediums nicht durch den Paraffinbelag das Glas angreifen kann, geht z. B. daraus hervor, „daß kleine Chlorkalium- oder Zuckerkristalle, die der Glaswand anlagern und vor der Paraffinhaut eingeführt waren, durch die Nährlösung selbst nach mehreren Monaten nicht im mindesten angegriffen wurden[2])" (MOLISCH a. a. O. 790).

Diese Methode führt aber natürlich nicht zum Ziele, wenn das Wasser oder die Lösungen auf hohen Temperaturen oder gar beim Kochen frei von den im Glas enthaltenen löslichen Substanzen bleiben sollen. Hier stehen uns nur zwei Wege offen: entweder wir nehmen Glasgefäße aus Bergkristall, dem für unsere Zwecke vollkommensten Material (KOHLRAUSCH, MYLIUS s. u.), oder wir suchen uns aus den verschiedenen Arten Glas die für unsere Zwecke tauglichsten aus. Bergkristallgefäße liefern W. C. Heraeus in Hanau und Dr. Siebert & Kühn in Cassel; Flaschen und Kölbchen sind aber naturgemäß recht teuer[3]), so daß sie als ständiger Ersatz für Glas nicht in Betracht kommen.

Bei gewöhnlichen Glasfabrikaten wird man sich vor allem auf relativ hohen Gehalt an Basen gefaßt machen müssen, die in die Nährlösung übergehen können. Man prüfe das Glas, indem man die Gefäße mit Eosin- oder Erythrosin-(Jodeosin-)lösung füllt (1 g Farbstoff auf 100 ccm wassergesättigten

---

1) MOLISCH a. a. O., 788, und O. RICHTER, siehe weiter unten.

2) MOLISCH verwandte die Methode bei Algenkulturen. Bei Kultur von Pilzen z. B. wird darauf zu achten sein, daß ihre Hyphen das Paraffin durchdringen können. Über paraffinzerstörende Organismen veröffentlichte kürzlich RAHN (Zbl. f. Bakt., II, 1906, **16**, 382) eine wichtige Arbeit. Vielleicht können unter Umständen bei Kultur von Mikroorganismen in paraffinierten Gefäßen Verunreinigungen des Paraffins störenden Einfluß gewinnen; man vergleiche die Mitteilung von DUGGAR (Bot. Gaz., 1901, **31**, **38**; näheres im Speziellen Teil: „Pilze"); man reinigt Paraffin, indem man durch Kochen mit Alkohol und KOH Fette und Fettsäuren entfernt und aus Äther umkristallisiert. Über die Durchlässigkeit von Paraffinöl *(Paraffinum liquidum)* und Vaseline für Wasser vergleiche z. B. ČELAKOVSKYS „Beiträge zur Fortpflanzungsphysiologie der Pilze", Prag (Fr. Řivnáč, 1906).

3) Ein Reagenzglas 10 : 100 mm kostet 8 Mk., ein Kölbchen von 30 ccm Inhalt 20 Mk. Gefäße aus „Vitreosil", reinem geschmolzenen Quarz, liefern die Deutschen Ton- und Steinzeug-Werke (A.-G.), Charlottenburg. — Die Quarzschmelze Dr. Voelker u. Co. (Beuel-Bonn) liefert Reagenzgläser aus transparentem Quarzglas (10 : 100 mm) für 2 Mk., Kölbchen von 50 cc Inhalt für 12 Mk. usw.

Äther) und die Farblösung 24 Stunden in ihnen stehen läßt; hiernach gießt man diese aus und spült mit Äther nach: bei schlechtem Glas bleibt ein roter Belag an der Gefäßwand haften.[1]) Namentlich bei Verwendung noch ungebrauchter Glassachen können diese beträchtliche Mengen Alkali an die Nährlösung abgeben; man koche sie daher mit schwach HCl-haltigem Wasser aus.

Glas stellt bekanntlich ein Gemisch von verschiedenen Silikaten — Verbindungen des Si mit irgendwelchen Metalloxyden — dar, unter welchen die mit Na, K, Mg, Ca, Zn und Fe gebildeten für unsere Zwecke besonders in Betracht kommen. Die Mischung der Silikate ist bei den verschiedenen Glassorten verschieden, so daß wir auch bei Anwendung verschiedener Fabrikate ungleiche Verunreinigungen unseres Wassers und unserer Lösungen zu gewärtigen haben. Man unterschätze diese unbeabsichtigten Beimengungen nicht; es liegt nur zu nahe, die Menge der lösbaren Substanz, die das Glas liefert, zu gering und das Mineralstoffbedürfnis der Organismen zu hoch einzuschätzen; in Wirklichkeit genügen die bei Anwendung bestimmter Glassorten aus dem Glas stammenden K- oder Mg-Mengen vollkommen, um das Bedürfnis Tausender von Zellengenerationen nach K oder Mg zu befriedigen.

Die aus dem Glas herauslösbaren Metalle gehören fast durchweg zu denjenigen Mineralstoffen, die für das Leben der Organismen unentbehrlich sind, kommen also im Gegensatz zu den aus kupfernen Rohren usw. mitgeführten Teilchen nicht als schädigende Substanzen in Betracht. Die Frage nach den Veränderungen, die Wasser durch die Gefäße erfährt, ist daher für viele Untersuchungen ganz belanglos und gewinnt erst bei exakten physiologischen Arbeiten, welche über die Notwendigkeit bestimmter Elemente für die Organismen Auskunft geben sollen, oder bei der Bearbeitung physikalisch-chemischer Aufgaben große Bedeutung. Wir müssen bei solchen über die chemischen Eigentümlichkeiten verschiedener Glasarten unterrichtet sein.[2])

---

1) Methoden zur Prüfung der verschiedenen Glasarten z. B. bei Mylius, F. u. Groschuff, E., Mikrochem. Proben z. Erkennung v. Glasarten (D. Mech.-Ztg. 1910, 41).

2) Wichtigste Literatur: Mylius und Förster, Über die Beurteilung der Glasgefäße zu chemischem Gebrauch (Zeitschr. f. Instrumentenkunde 1891, **11**, 311), Förster, Vergleichende Prüfung einiger Glasarten usw. (Zeitschr. f. anal. Chemie 1894, **33**, 381), Heraeus, N., Bericht d. 5. internat. Kongr. f. angew. Chemie, 1904, **1**, 708), Mylius, Über die Klassifizierung der Gläser z. chem. Gebrauche (ibid. 678) und besonders Hovestadt, H., Jenaer Glas u. seine Verwend. in Wiss. und Technik, Jena 1900; daselbst die einschlägige Literatur zusammengestellt. — Aus der biologischen Literatur nenne ich Herbst, Über d. z. Entw. d. Seeigellarven notw. Stoffe usw. II (Arch. f. Entwicklungsmech. 1901, **11**, 617), Benecke, Die Bedeutung des Kaliums und des Magnesiums für Entwicklung und Wachstum des *Aspergillus niger* v. Th. usw. (Botan. Zeitg. 1896, **54**, 97), Untersuchungen über den Bedarf der Bakterien an Mineralstoffen (ibid. 1907, **65**, 1), Ficker, M., Über Lebensdauer u. Absterben pathogener Keime (Ztschr. f. Hyg. 1898, **29**, 1); Hesse, G., Beitr. z. Herstellung von Nährböden u. z. Bakterienzüchtung (Zeitschr. f. Hyg. 1904, **46**, 1); Kohn, E., Zur Biol. d. Wasserbakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **15**, 690); Kaserer, H. J., Kenntn. d. Mineralstoffbedarfs von *Azotobacter* (Ber. d. d. Bot. Ges. 1910, **28**, 208).

Sehr auffallend sind nach dem soeben Gesagten die Ergebnisse MORTENSENS, welcher beobachtete, daß Pulver der gewöhnlichen Glassorten auf Pilze giftig wirkt. Fortsetzung der von ihm begonnenen Untersuchungen wäre erwünscht.[1])

Je mehr lösliche Bestandteile das Wasser dem Glas entzieht, um so besser wird die elektrische Leitfähigkeit des Wassers. Man kann sich daher über den Gehalt des Wassers an gelösten Elektrolyten auf physikalischem Wege bequem orientieren[2]); die maßanalytische Untersuchung des Wassers kann freilich durch jene Methode nicht überflüssig gemacht werden.

Von denjenigen Glassorten, welche arm an löslichen Bestandteilen sind, kommen um so mehr in Betracht: das Jenaer Glas von SCHOTT und Genossen, das Resistenzglas von EHRHARDT und METZGER in Darmstadt, das Wiener Normalglas und das Rheinische Normalglas.

Das Jenaer Geräteglas[3]) enthält nach BENECKE (1907) ca. 5 % Mg O.

Wichtig für den Biologen ist, daß K in ihm gänzlich fehlt; wohl aber können Mg und Zn aus ihm herausgelöst werden; HERBST fand nach doppelter Destillation aus Jenaer Glas in 3 Litern Wasser 0,00015 g Mg und 0,0004 g Zn.[4])

MORTENSEN (s. o.) beobachtete, daß Pulver von Jenenser Normalglas keine Giftwirkungen auf Aspergillus ausübt.

Das Resistenzglas von EHRHARDT und METZGER[5]) enthält:

K_2O	0,6 %
Na_2O	14,3 %
CaO	11,2 %
MnO	0,4 %

1) MORTENSEN, L., Vers. üb. d. Giftwirkung in Kobaltsalzen auf Asp. niger bei Kultur auf festen u. flüss. Medien (Zbl. f. Bakt. II, 1909, **24**, 521).

2) E. SMITH (Bacteria in relation to plant diseases Vol. I, Washington 1905, 129) gibt einige Zahlen an. Gläser, die 10—11 Tage mit Wasser gefüllt geblieben waren, beeinflußten dieses in folgendem Grade:

Resistenzglas (Greiner & Friedrichs)	nach	10	Tagen	220,000 Ohm.
„ „ „ „	„	11	„	219,000 „
Gewöhnliches Glas	„	10	„	41,400 „
„ „	„	11	„	34,000 „

Vgl. auch MYLIUS a. a. O., 1904.

3) Die Kolben, Flaschen usw. tragen einen kennzeichnenden Stempel, in die Glasröhren ist ein farbiger Glasfaden eingelegt. HOVESTADT a. a. O., 397 gibt für Jenaer Geräteglas an:

SiO_2	65 —68 Teile
Al_2O_3	3,3— 3,7 „
ZnO	3,7— 4,6 „
BaO	12 „
B_2O_3	13 —15 „

4) Über das Gas, welches von Jenenser Glas in hohen Temperaturen abgegeben wird, vgl. GUICHARD (C. R. Acad. Sc. Paris 1911, **152**, 876).

5) Kenntlich an dem Stempel „R“.

$$\left.\begin{array}{l} Al_2O_3 \\ Fe_2O_3 \end{array}\right\} 2{,}9\ \%$$
$$SiO_2 \quad 70\ \%,$$

ist mithin sehr arm an Kali, enthält übrigens auch Mg (BENECKE 1907).

Wiener Normalglas enthält reichlich K, scheint aber Mg-frei zu sein (BENECKE 1907).

Will man sich beim Destillieren des Wassers alle Erfahrungen zunutze machen, so akzeptiere man O. RICHTERS Verfahren.[1])

RICHTER benutzte „Jenenser Glaskolben, die mittels eingeriebener Glasstöpsel mit einem Platinkühler in Verbindung standen, von dem das kondensierte Wasser in einen 400 ccm-Kolben, der mit Paraffin bis zum oberen Rand ausgekleidet war, abtropfte. War dann das Kölbchen bis etwa 300—350 ccm gefüllt, so schüttete ich das destillierte Wasser in einen mit Paraffin völlig ausgekleideten Zweiliter-Erlenmeyerkolben. Ein Wattepfropf aus reinster Watte besorgte dessen Verschluß. War im „Siedekolben" noch etwas zur Destillation bestimmtes Wasser übriggeblieben, so wurde es ausgeschüttet und der Kolben bis zu 350—400 ccm neu gefüllt. Um einen Siedeverzug zu vermeiden, befand sich ein Stück Platindraht im Kochkolben. Hervorgehoben sei noch, daß alle für die Destillation verwendeten Geräte, also Destillationskolben, Platinkühler, Vorstoßkolben, Stöpselvorstoß, der große Zweiliter-Vorratskolben mit Kalilauge und darauf mit konzentrierter Salzsäure gereinigt und mit viel gewöhnlichem destillierten Wasser abgespült worden waren. Jene Kolben und Objekte, die mit Paraffin ausgekleidet werden sollten, waren nachher im heißen Trockenkasten auf 110—140° erhitzt und so vollkommen wasserfrei gemacht worden; dann hatte ich sie mit reinstem Paraffin des Siedepunktes 78° von MERCK versehen und neuerlich über 100°, oft bis 140° erhitzt." RICHTER gewann mit seiner Methode reinstes Wasser, das nicht einmal SiO_2 gelöst enthielt.[2])

II. Nährboden.

Sät man Mikroorganismen auf reinem Wasser aus, so kann man zwar oft genug Wachstumserscheinungen und andere Veränderungen an ihnen beobachten; alle diese Vorgänge, an welchen die den Zellen ermöglichte Wasseraufnahme hervorragenden Anteil hat, spielen sich aber auf Kosten der im Aussaatmaterial vorhandenen Stoffe ab, — die allerdings nicht selten dazu ausreichen, um von der Keimung der Sporen bis zur neuen Bildung solcher auszureichen (Gemmen bei Mucoraceen, Konidien bei Penicillium usw.). Wasser kann somit wohl als Kulturmedium für manche Fälle und Zwecke

1) Zur Physiologie der Diatomeen. (Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturwiss. Kl. 1906, **115**, I, 27, 37.)

2) Über die Leitfähigkeit des Wassers und die Herstellung von Leitfähigkeitswasser vgl. z. B. KOHLRAUSCH u. HOLBORN, Leitvermögen der Elektrolyte, KOHLRAUSCH, Lehrb. d. prakt. Physik, 9. Aufl., 1901, 408ff.

genügen, als Nährboden darf es naturgemäß niemals angesprochen werden; denn unter einem Nährboden verstehen wir irgendeine Flüssigkeit oder feste Substanz, in welcher den Mikroorganismen irgendwelche zum Aufbau ihrer Substanz verwendbare Stoffe geboten werden, derart, daß beim Aufenthalt auf einem Nährboden das Trockengewicht des Organismenmaterials zunimmt, während es auf einem nicht nährenden Kultursubstrat, z. B. auf reinem Wasser, unverändert bleibt oder sogar abnimmt.

Daß die Kenntnis von den Nährböden und ihrer zweckmäßigen Herstellung für das Studium der Mikroorganismen von allergrößter Bedeutung ist, leuchtet ohne weiteres ein. Wir werden im folgenden die wichtigsten Gesichtspunkte für diese Aufgabe kurz zu erörtern haben. —

Die Fragen, die bei der Erforschung eines Organismus und insbesondere seiner Ernährungsphysiologie gestellt werden müssen, sind außerordentlich mannigfaltig. Die Wahl eines Nährbodens darf nicht beliebig geschehen, sondern muß planmäßig den Aufgaben des Forschers Rechnung tragen. Allerhand Umstände erschweren dabei — zumal dem Anfänger — das Auffinden eines zweckmäßigen Kulturverfahrens. Vor allem ist der Nährwert verschiedener Stoffe — C-Verbindungen, N-Verbindungen u. dgl. — ein sehr ungleicher und selbst Vertreter einer Gruppe chemischer Verbindungen können auf ein und denselben Organismus ganz verschieden wirken. Dazu sind die Ansprüche verschiedener Arten von Mikroorganismen in punkto der Ernährung außerordentlich verschieden: Stoffe, die für manche Gruppen der Mikroorganismen ein ideales Nährmittel darstellen, sind für andere nur mäßig gut nährend oder schlechterdings unverwertbar. Ferner: es kommt nicht nur darauf an, daß den Organismen die „richtigen“ Stoffe ausgewählt werden, sie müssen auch in der richtigen Form und unter zuträglichen Begleitumständen geboten werden: die Konzentration vor allem ist in Rechnung zu ziehen, die Wahl zwischen festen und flüssigen Nährböden, ferner die Reaktion, d. h. der Grad der Alkaleszenz und Azidität richtig zu treffen; es ist weiterhin zu berücksichtigen, daß manche Stoffe nur ausgenützt werden können, wenn gleichzeitig bestimmte andere Stoffe vorhanden sind, daß die über dem Nährboden liegende Atmosphäre in ihrer chemischen Zusammensetzung eine wichtige Rolle spielen kann u. a. m. — Drittens: selbst wenn eine Kombination der Bedingungen gefunden ist, bei welcher die Organismen vortrefflich wachsen, so genügt oft genug dieses Resultat noch keineswegs für die Erforschung des Organismus und seiner Ernährungsansprüche; wie unter verschiedenen Bedingungen viele Substanzen in verschiedener Form auskristallisieren, so produzieren auch die Organismen unter verschiedenen Ernährungsbedingungen ganz verschiedene Formen; wir werden uns nicht mit dem Resultat, eine geeignete Nährstoffkombination gefunden zu haben, begnügen dürfen, wenn wir auf dem Wege der künstlichen Kultur ermitteln wollen, was für Entwicklungsmöglichkeiten einem Organismus offen stehen, und wenn wir ihn in diesem Sinne „ganz“ kennen lernen wollen.

Was für Stoffe müssen nun einem wasserhaltigen Kulturmedium zugesetzt werden, damit es zu einem Nährboden wird und die Entwicklung der Mikroorganismen gestattet? Zunächst sind Aschenbestandteile unerläßlich. Es gibt überhaupt keine Organismen, die ohne Zufuhr von solchen sich entwickeln könnten, wohl aber gibt es viele, deren beispiellose Anspruchlosigkeit ungezählte Zellengenerationen mit den Mineralstoffen auskommen läßt, die im gewöhnlichen destillierten Wasser vorhanden sind oder aus Glas geringer Qualität herausgelöst werden können. Sollen daher genaue Untersuchungen über die Notwendigkeit und die Rolle des einen oder anderen der Aschenbestandteile angestellt werden, so muß man nach den oben gegebenen Vorschriften alle Verunreinigungen des Nährmediums durch das Glas nach Möglichkeit fernhalten. Merkwürdig genug ist, daß fast alle Organismen die gleichen Ansprüche an Aschenstoffe stellen und S, P, K, Ca, Mg und Fe nötig haben.

Ferner muß dem Sauerstoffbedürfnis der Organismen Rechnung getragen werden: den Sauerstoff liefert die Atmosphäre; wohl zu beachten ist aber, daß viele Bakterien nur bei Luftabschluß sich entwickeln können.

Am schwierigsten zu beantworten ist von Fall zu Fall die Frage nach den organischen Verbindungen, die der Organismus benötigt.

Als Kohlenstoffquelle kommt nur für die grünen Lebewesen und einige Bakteriengruppen die Kohlensäure der Luft in Betracht. In allen anderen Fällen müssen organische Verbindungen als C-Quelle dem Nährsubstrat zugesetzt werden. Dazu sind im allgemeinen die Zuckerarten und die mehrwertigen Alkohole besonders geeignet. Empirisch muß den verschiedenartigen Organismen gegenüber ausprobiert werden, ob auch einwertige Alkohole, aliphatische und aromatische Säuren und deren Salze oder andere C-haltige Verbindungen tauglich sind, und wie hoch ihr Nährwert zu veranschlagen ist.

Als Stickstoffquelle kann der elementare N der Luft nur gewissen Pilzen und Bakterien dienen; im allgemeinen müssen N-Verbindungen dem Nährmedium beigemischt werden. Die Auswahl ist groß: manche Organismen bevorzugen anorganisch gebundenen N (Ammoniumsalze, Nitrite, Nitrate), andere beanspruchen Amidoverbindungen oder gar Albumosen. Die Frage, bei welcher N-Quelle optimales Wachstum erreicht wird, muß für jede Organismengruppe oder sogar für einzelne Spezies durch besondere Experimente gelöst werden.

Von größter Wichtigkeit ist schließlich Reaktion und Konzentration des Nährbodens. Manche Organismen gedeihen nur auf saurem, andere nur auf alkalischem Medium, noch andere kommen mit beidem aus. Die zulässige Konzentration schwankt zwar oft zwischen weiten Grenzen, doch wird das Wachstum der Organismen quantitativ und qualitativ stark von ihr beeinflußt.

Schließlich muß auch noch der Aggregatzustand des Nährsubstrats berücksichtigt werden: flüssige Nährmedien wirken oft ganz anders als feste.

Wir begnügen uns vorläufig mit der Andeutung dieser wichtigsten Fragen, die bei der Prüfung eines Nährmediums und der ernährungsphysiologischen Erforschung eines Organismus zu stellen sind und gehen zur Schilderung der Nährmedien selbst über. Bei Besprechung der organischen Nährlösungen wird sich Gelegenheit finden, auf einige ernährungsphysiologische Fragen näher einzugehen.

1. Flüssige Nährmedien.

Flüssige Nährmedien, d. h. wässerige Lösungen von Nährstoffen enthalten entweder ausschließlich anorganische Nährmittel (anorganische Nährlösungen) oder organische Verbindungen — kombiniert mit anorganischen oder ohne solche (organische Nährlösungen). Bei den letzteren sind diejenigen, deren Zusammensetzung rezeptmäßig bekannt ist und genau innegehalten werden kann, zu unterscheiden von anderen, deren Zusammensetzung nur unvollkommen bekannt und wechselnd ist. Das Material für die Herstellung der ersten Gruppe liefern die aus dem chemischen Laboratorium stammenden Stoffe, die anderen entstammen irgendwelchen animalischen oder vegetabilischen Naturobjekten.

a) Anorganische Nährlösungen.

Eine anorganische Nährlösung, deren biologische, tier- und pflanzengeographische Bedeutung einzig dasteht, ist das Meerwasser.

Abgesehen von den Teilen des Meeres, die durch wasserreiche Ströme eine allmähliche Aussüßung erfahren, wie die Ostsee, ist die Zusammensetzung des Meereswassers überall ungefähr dieselbe. FORCHHAMMERS Analyse des zwischen Neapel und Sardinien geschöpften Meerwassers gibt folgende Zusammensetzung an:[1])

NaCl	30,192 ‰
KCl	0,779
$MgCl_2$	3,240
$MgSO_4$	2,638
$CaSO_4$	1,605
Kieselsäure, phosphorsaures Ca u. „Rückstand“ (darunter $CaCO_3$ u. Fe_2O_3)	0,080

In diesen und ähnlichen Analysen vermißt man stickstoffhaltige Verbindungen ganz und gar; in der Tat sind Nitrite und besonders Nitrate ungemein spärlich im Meereswasser vorhanden; die Ammoniumverbindungen

1) Vgl. HERBST, C., Über die zur Entwickl. d. Seeigellarven notwend. anorg. Stoffe, ihre Rolle und ihre Vertretbarkeit I (Arch. f. Entwicklungsmech. 1897, 5, 649). Von geologischer Literatur nenne ich ROTH, Chemische Geologie 1879, 1, 524ff. und KRÜMMEL, O., Handb. d. Ozeanographie, 1, Stuttgart 1907.

sind etwas reichlicher und bereits quantitativ bestimmbar — im allgemeinen wenig mehr als 0,1 mg pro Liter.[1])

Will man bei Benutzung des Meerwassers als Kulturmedium von zufälligen Verunreinigungen des Wassers unabhängig bleiben oder den Einfluß planmäßig variierter Zusammensetzung auf die Organismen studieren, so muß man sich Meerwasser künstlich herstellen. Am eingehendsten hat sich HERBST (a. a. O.) mit der Frage beschäftigt. Dieser Autor legt der Anfertigung künstlichen Meerwassers von „normaler" Zusammensetzung folgendes Rezept zugrunde:

auf Wasser	100 Teile	
NaCl	3 g	
KCl	0,07 „	
$MgSO_4$	0,26 „	
$MgCl_2$	0,5 „	(nur scheinbar reichlich, das Salz war sehr wasserreich)
$CaSO_4$	0,1 „	
	3,93 g	

und verfährt in der Weise, daß zunächst eine Lösung von NaCl, KCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$ und $CaSO_4$ hergestellt wird. „Hierzu wurde sodann eine Messerspitze voll phosphorsauren Kalkes gefügt und das Gemisch öfter tüchtig geschüttelt. Den ungelöst gebliebenen Rest — es löst sich bekanntlich nur sehr wenig — filtrierte ich gewöhnlich erst nach ca. 15 Stunden ab . . ." Hiernach wird die Lösung des Kalziumkarbonats in Angriff genommen: HERBST schüttete in die vorliegende Lösung eine Messerspitze gefälltes Kalziumkarbonat und leitete je nach der Menge der Lösung (einige hundert ccm — 1 l) in langsamem Strom Kohlensäure ½—1½ Stunden hindurch und sorgte durch Umrühren dafür, daß das Kalziumkarbonat suspendiert blieb; dann blieb das Gefäß mit Kohlensäure über der Lösung ca. 12 Stunden verschlossen stehen. Später wurde die Lösung filtriert, gehörig mit Luft geschüttelt und auf 24—48 Stunden — gegen Verdunstung geschützt — in flache Glasschalen gebracht; dadurch wurde die Mischung von der überschüssigen freien Kohlensäure befreit und mit der nötigen Menge Sauerstoff versehen; hiernach Abfiltrieren des ausgefallenen überschüssigen Karbonats. Fiel aus der Lösung „auch nach mehrtägigem Stehen kein Kalk mehr aus und besaß sie die übrigen Salze in denselben Mengenverhältnissen wie das Meerwasser, so konnte man sicher sein, eine Mischung von ungefähr demselben Gehalt an kohlensaurem Kalk wie das letztere zu haben." Nachträglicher geringer Kalkausfall, der gelegentlich eintrat, wirkte bei HERBSTS Kulturen nicht störend. — Die Sauer-

1) Literatur (NATTERER, THOULET u. a.) bei BRANDT: Über den Stoffwechsel im Meere I u. II (Wissensch. Meeresunters. Abt. Kiel 1899, N. F. 4 u. 1902, 6); Über die Bedeutung der Stickstoffverbindungen für die Produktion im Meere (Beih. z. Bot. Zbl. 1904, 16, 383).

stoffdurchlüftung erreichte Herbst nicht nur durch Stehenlassen in Schalen, sondern auch mit Hilfe eines Durchlüftungsapparates.[1])

Für die meisten Fälle wird ein sehr viel roheres Verfahren ausreichen. Ich gebe hier das Rezept, nach welchem das Wasser der großen Austernbecken auf der Pariser Weltausstellung angefertigt war, und das sich gut bewährte[2]):

NaCl	78 g
$MgCl_2$	11 „
KCl	3 „
$MgSO_4$	5 „
$CaSO_4$	3 „
	100 g auf 3 l Wasser.

Karbonatfreies Meerwasser stellt sich Maas[3]) dadurch her, daß er gewöhnliches Meerwasser eindampft und den Rückstand in destilliertem Wasser wieder löst. Die löslichen Bikarbonate werden beim Eindampfen in die so gut wie unlöslichen Karbonate umgewandelt.

Wie man meerwasserähnliche, relativ salzreiche Lösungen zur Kultur mariner Algen benutzen kann, wird im Speziellen Teil mitzuteilen sein. —

Das Meerwasser, dessen Zusammensetzung uns von der Natur gegeben ist, enthält vor allem in dem Chlornatrium einen Stoff, dessen Notwendigkeit für die Mikroorganismen keineswegs allgemein erwiesen ist, und der für die vom Meerwasser umspülten Lebewesen hauptsächlich durch seine osmotische Wirkung bedeutsam wird.[4]) Nur für die marinen Organismen kommt Meerwasser als Nährlösung in Betracht; alle anderen werden in Flüssigkeiten von weit geringerem osmotischen Druck kultiviert werden müssen.

Die Nährlösungen, die im Laboratorium künstlich hergestellt werden, und deren Zusammensetzung nur von der Willkür des Forschers abhängt, werden im allgemeinen möglichst einfach sein und nur die wirklich notwendigen Stoffe enthalten. Anorganische Nährlösungen, welche nicht nur keine organische Stickstoffverbindung, sondern auch keine Kohlenstoffquelle enthalten, kommen nur für die autotrophen Mikroorganismen in Betracht: für die Algen, die grünen Flagellaten und gewisse Bakterien. Für die ersteren können wir an die Erfahrungen anknüpfen, die seit Sachs und Knop an höheren Pflanzen gesammelt worden sind.

---

1) Weitere Ergänzungen über Herstellung von künstlichem Meerwasser a. a. O., 653ff.

2) Perrier, E., De l'emploi de l'eau de mer artificielle pour la conservation de animaux marins et en particulier des huîtres dans les grands Aquarium (C. R. Acad. Sc. Paris 1890, **110**, 1076). — Über filtriertes Meerwasser vgl. Fabre-Domergue, Epuration bactérienne des huîtres par la stabulation en eau de mer artif. filtrée (ibid. 1912, **154**, 393).

3) Über die Wirkung der Kalkentziehung auf die Entwicklung der Kalkschwämme (Sitzungsber. Ges. Morph. u. Phys., München 1904, **20**, 4).

4) Ob es vielleicht für die höheren Lebewesen damit anders steht, ist noch nicht genügend geklärt; vgl. Herbst a. a. O., sowie die späteren Teile der gleichen Abhandlung.

BIRNER und LUCANUS[1]) nehmen

1000	g	Wasser,
0,5	„	Magnesiumsulfat,
1,5	„	Kalziumnitrat,
1,0	„	saures phosphorsaures Kalium,
1,1	„	phosphorsaures Eisenoxyd.

KNOP empfiehlt

auf 1000	g	Wasser
0,25	„	Magnesiumsulfat,
1,00	„	Kalziumnitrat,
0,25	„	saures phosphorsaures Kalium,
0,12	„	Chlorkalium,
Spur		Eisenchlorid

und SACHS

auf 1000	g	Wasser
1,0	„	salpetersaures Kalium,
0,5	„	Chlornatrium,
0,5	„	Kalziumsulfat,
0,5	„	Magnesiumsulfat,
0,5	„	phosphorsauren Kalk,
Spur		Eisenchlorid.

TOLLENS nimmt von drei Lösungen

A.	100	g	Kalziumnitrat,	B.	25	g	saur. phosphors. Kali,
	25	„	Kaliumnitrat,		1	l	Wasser
	15	„	Chlornatrium,	C.	50	g	Magnesiumsulfat,
	1	l	Wasser		1	l	Wasser

je 100 ccm auf 10 l Wasser.[2])

Solcher Lösungen sind noch verschiedene von den Autoren empfohlen worden; von KNOP stammt eine Lösung, die auf

7000	g	Wasser
4	„	$Ca(NO_3)_2$,
1	„	KNO_3,
1	„	$MgSO_4$ ($7\,H_2O$),
1	„	H_2KPO_4,
0,5	„	KCl und
Spur		Eisenchlorid

enthält. KCl ist dabei entbehrlich. MOLISCH schließlich benutzte folgende Nährlösung:

250	g	Wasser,
0,2	„	$(NH_4)_2HPO_4$,
0,1	„	H_2KPO_4,

1) Die Literatur über anorganische Nährlösung ist in den bekannten Hand- und Lehrbüchern für Pflanzenphysiologie (PFEFFER, JOST u. a.) zu finden.

2) Üb. einige Erleicht. bei d. Kultur d. Pfl. in wäss. Lös. (Journ. f. Landwirtsch. 1882, **30**, 537; vgl. Bot. Jahresber. 1882, **10**, a. 36).

0,1 „ $MgSO_4$,
0,1 „ $CaSO_4$,
Spur Eisenvitriol (2 Tropfen einer 1 % Lösung).

Auf die Reaktion der meisten genannten Lösungen ist die Wahl der Kalium-Phosphorverbindung von Einfluß: Monokaliumphosphat reagiert sauer, Dikaliumphosphat alkalisch, Trikaliumphosphat neutral — Reinheit der Chemikalien vorausgesetzt.

Das oft auf verdünnten Nährlösungen schwimmende Häutchen besteht wohl größtenteils aus Kalziumkarbonat.

Bei der Anfertigung der Lösungen löse man die einzelnen Salze gesondert auf und gieße die Lösungen zueinander; andernfalls entstehen lästige Niederschläge von Magnesiumphosphat. Vor dem Gebrauch sind die Lösungen je nach Bedarf zu verdünnen: 0,1—0,5 % sind z. B. für Algen im allgemeinen ausreichend und empfehlenswert, doch werden auch höhere Konzentrationen vertragen. Tollens gibt an, wie man höhere Konzentrationen der Lösung vorrätig halten kann (s. o.).

Die von v. d. Crone[1]) vorgeschlagene Nährlösung, welche folgende Stoffe enthält:

KNO_3	1,0
$MgSO_4$	0,5
$CaSO_4$	0,5
Trikalziumphosphat	0,25
Ferrophosphat	0,25

ist meines Wissens noch nicht für Mikroorganismen ausprobiert worden.

Bei der Zusammenstellung von Salzgemischen zum Zweck der Organismenkultur ist zu bedenken, daß von den Kationen bestimmter Salze Giftwirkungen ausgehen, die bei gleichzeitiger Gegenwart anderer Salze herabgesetzt werden können. Osterhout wies nach, daß sämtliche Salze des Meerwassers, einzeln angewandt, auf die Zellen der Algen giftig wirken; Salzgemische, welche die einzelnen Komponenten in solchem Verhältnis enthalten, daß sie den Zellen nicht schädlich sind, nennt Osterhout[2]) „physiologically balanced solutions" (ausgeglichene Lösungen): Meerwasser stellt eine solche dar.

Lipman hat dargetan, daß Salzlösungen auf die Ammonentbindung (aus Pepton) durch *Bac. subtilis* dann am wenigsten hemmend wirken, wenn die Salze in demselben Verhältnis dargeboten werden, wie sie im Seewasser vorliegen.[3])

---

1) Ergebn. d. Unters. über die Wirkung d. Phosphorsäure auf höhere Pflanzen (Sitzungsber. niederrhein. Ges. f. Naturwiss. u. Heilk. 1902).

2) Vgl. z. B. Osterhout, W. J. V., On the importance of physiol. balanc. sol. on plants I (Bot. Gaz. 1906, **42**, 127).

3) Lipman, C. B., On physiologically balanced solutions for bact. (Bot. Gaz. 1910, **49**, 207).

b) Organische Lösungen bekannter Zusammensetzung.

Diese enthalten neben anorganischen Verbindungen entweder nur eine organische Kohlenstoffquelle oder außer dieser auch noch eine organische Stickstoffverbindung. Die anorganischen Verbindungen — denn als solche wird man die Aschenbestandteile vorzugsweise verabfolgen wollen — können dabei quantitativ sehr zurücktreten; ja, es werden oft die Beimengungen von Aschenbestandteilen, welche ohne besondere Fürsorge mit dem Wasser und nicht völlig reinen Chemikalien und aus den Glasgefäßen durch Auslaugung in die Lösung hineinkommen, den Bedarf der Organismen decken.

Organische Bestandteile sind deswegen nötig, weil die Organismen, für welche die organischen Lösungen bestimmt sind, nicht selbst aus anorganischen Verbindungen organische Stoffe herzustellen vermögen. Während die „assimilierenden", die mit Chlorophyll ausgestatteten und einige wenige andere Organismen aus Kohlensäure und Wasser selbst komplizierte Kohlenstoffverbindungen herstellen, müssen den nicht assimilierenden Lebewesen geeignete C-Verbindungen verabfolgt werden; während viele unter ihnen ihre Eiweißstoffe aus Kohlehydraten und anorganisch gebundenem Stickstoff aufbauen, sind andere zu derartigen synthetischen Leistungen nicht befähigt und fordern organisch gebundenen Stickstoff, viele sogar Eiweißverbindungen. Die Bedürfnisse an die organische Ernährung sind somit bei den verschiedenen Organismen sehr ungleiche: eine Universalnährlösung, die für alle Arten der Mikroben tauglich wäre oder gar ihnen allen optimales Wachstum gestattete, gibt es daher nicht. Auf die Frage, welche Stoffe bei Anfertigung einer Nährlösung zweckmäßigerweise zu vereinigen sind, läßt sich daher nicht kürzer als durch Vorführung verschiedener Mikrobengruppen und die Schilderung ihrer Ernährungsansprüche Antwort geben.

Kohlenstoff. Sehen wir von den chlorophyllhaltigen Lebewesen, welche die Kohlensäure der Luft als C-Quelle verwerten, und von denjenigen Bakterien ab, welche atmosphärische Kohlensäure[1]), die Karbonate oder Methan als C-Quelle verwerten können[2]), so muß allen übrigen der Kohlenstoff im Nährsubstrat als mehr oder minder wasserlöslicher organischer Körper geboten werden. Als wichtigste C-Quelle kommt für Organismen jeder Art die Gruppe der Zucker (Kohlehydrate) in Betracht: Traubenzucker zumal und Rohrzucker sind vorzügliche Nährstoffe. Sie wirken oft schon in großer Verdünnung — weniger als 1‰ — und werden von manchen Organismen selbst in 100 %iger Lösung noch ertragen. Weiterhin sind Maltose,

1) Beyerinck u. v. Delden, Über eine farblose Bakterie, deren Kohlenstoffnahrung aus d. atmosph. Luft stammt (Zbl. f. Bakt. II, 1903, **10**, 33).

2) Z. B. Söhngen, Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung u. Energiequelle gebrauchen (ibid. II, 1906, **15**, 513).

Milchzucker, Raffinose u. a., von den Polysacchariden Inulin, Glykogen, Stärke usw. wichtige Nährmittel, ferner die mehrwertigen Alkohole, wie Glyzerin, Mannit, Sorbit, Dulcit u. a. Solange für einen Organismus nicht abweichendes Verhalten bekannt ist, wird man ihn mit Verbindungen der genannten Art zu ernähren suchen. Es folgen die organischen Säuren der aliphatischen Reihe, wie Essigsäure, Apfelsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure und besonders ihre Salze; die organischen Ammoniumsalze sind nicht nur vortreffliche Kohlenstoffquellen, sondern liefern auch gleichzeitig Stickstoff (s. u.). Von geringerer Bedeutung und vielfach nur für bestimmte Gruppen von Organismen brauchbar sind die einwertigen Alkohole, die Glykoside und der Harnstoff, der gleichzeitig als N-Quelle dienen kann; sehr ungleichwertig als C-Quellen sind die aromatischen Säuren.[1]) In geringem Maße können manche Organismen, namentlich eine Reihe von Pilzen, ihren C-Bedarf von fetten Ölen decken, einige Bakterien und Pilze verwerten Zellulose, neuerdings wurden sogar Paraffin verarbeitende Organismen bekannt.[2]) Huminsäure scheint nach NIKITINSKY[3]) so gut wie gar nicht als C-Quelle in Betracht zu kommen. Von einigen dieser Fälle wird später im Speziellen Teil noch zu sprechen sein.

Kohlenstoffverbindungen allein reichen zur Ernährung eines Organismus nicht aus; es muß ihm auch irgendeine Stickstoffquelle geboten werden. In ihren Ansprüchen an elementaren, anorganisch oder organisch gebundenen Stickstoff gehen nun die verschiedenen Mikroorganismen stark auseinander. Wenn bei der folgenden Schilderung ihrer N-Ernährung nichts besonderes über die C-Ernährung gesagt ist, so gilt stillschweigend irgendein Zucker als Kohlenstoffquelle.

Stickstoff. Zunächst sind höchst einfache Nährlösungen zu nennen, die überhaupt keine N-Quelle, wohl aber Kohlehydrate enthalten; WINOGRADSKY[4]) entdeckte, daß gewisse anaërobe Bodenbakterien in völlig N-freier Zuckerlösung gedeihen und diese in wenigen Tagen stickstoffreich machen, indem sie den Stickstoff der Luft verarbeiten.

Nach BEYERINCKS und v. DELDENS Ansicht[5]) sind freilich die von WINOGRADSKY studierten Formen in völlig N-freien Medien nicht kultivierbar; sie gehören vielmehr zu den „oligonitrophilen" Organismen, welche „sich in Nährmedien entwickeln, ohne absichtlich zugefügte Stickstoffverbindungen,

1) Vgl. Literaturangaben bei CZAPEK, Biochem. d. Pfl., Jena 1905, **1**, 296.

2) RAHN, O., Ein Par. zersetzender Schimmelpilz (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **16**, 382).

3) REINITZER, F., Üb. d. Eignung d. Huminsubst. z. Ernähr. v. Pilzen (Bot. Ztg. 1900, **58**, 59); NIKITINSKY, Über d. Zersetzung d. Huminsäure usw. (Jahrb. für wiss. Bot. 1902, **37**, 365). Daselbst weitere Literaturangaben.

4) S. l'assim. de l'azote gazeux. de l'atmosph. p. l. microbes (C. R. Acad. Sc. Paris 1893, **116**, 1385); Rech. sur l'assim. de l'azote libre de l'atmosph. p. l. micr. (Arch. Sc. biol., St. Petersbourg 1895, **3**); *Clostridium Pastorianum*, seine Morph. u. seine Eigenschaften als Buttersäureferment (Zbl. f. Bakt. II, 1902, **9**, 43) u. a.

5) Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien (ibid. 1902, **9**, 3).

aber auch ohne daß Fürsorge getroffen wird, um die letzten Spuren dieser Verbindungen zu entfernen".[1])

Fast alle anderen Organismen sind auf beträchtliche Mengen gebundenen Stickstoffs in ihrer Nährlösung angewiesen.

Nährlösungen, welche neben Kohlenstoffverbindungen u. a. Nitrate ($NaNO_3$ oder KNO_3) enthalten, kommen für die Kultur der verschiedensten Organismen — der Bakterien, Pilze und Algen — in Betracht. Organismen, welche bei Nitraternährung sich besser entwickeln als mit jeder andern Stickstoffnahrung, kann man als Nitratorganismen bezeichnen.

Nitrite gelten als giftig. TREBOUX[2]) hat aber darauf aufmerksam gemacht, daß salpetrigsaure Salze eine gute N-Quelle abgeben können, solange die Nährlösung alkalisch reagiert. In saurer Lösung wird salpetrige Säure frei, und diese wirkt stark giftig. Nach TREBOUX kommen die Nitrite als Stickstoffquelle für die verschiedensten — grünen und farblosen — Organismen in Betracht. Als Nitritorganismen sind die in anorganischen Lösungen wachsenden Nitratbildner (Nitrifikationsmikroben) zu nennen. Über Nitritverbrauch durch Mikroorganismen anderer Art machten außer TREBOUX bereits LAURENT)[3], BEYERINCK[4]), WINOGRADSKY[5]) u. a. einige Angaben.

Ammoniaksalze spielen in der Natur als Stickstoffquelle der verschiedensten Organismen die allergrößte Rolle. In künstlichen Kulturen sieht man auch diejenigen Pilze und Bakterien, welche als Nitratorganismen anzusprechen sind, vielfach auf Ammoniaksalzen noch gedeihen; andrerseits gibt es eine Reihe von Lebewesen, welche Nitrate ablehnen und Ammonium beanspruchen („Ammoniakorganismen"). Wählt man die Ammoniaksalze organischer Säuren (Essigsäure, Apfelsäure, Milchsäure, Weinsäure oder anderer), so können die Mikroben außer N auch C von ihnen beziehen, so daß die Beigabe von Kohlehydraten als besonderer C-Quelle überflüssig wird.

Die Ernährung durch organische Ammoniumsalze empfiehlt sich besonders dann, wenn bei subtilen ernährungsphysiologischen Versuchen die bei Anwendung von Zucker unvermeidlichen Verunreinigungen ausgeschlossen bleiben sollen; MOLISCH[6]) nimmt daher für Pilzkulturen 2 % essigsaures Ammoniak.

Die wichtigsten von den organischen Stickstoffquellen sind die Amidokörper, die Albumosen und Pepton.

---

1) BEYERINCK, Über oligonitrophile Mikroben (ibid. II, 1901, **7**, 561).

2) Zur Stickstoffernährung der grünen Pflanze (Ber. d. D. Bot. Ges. 1904, **22**, 570).

3) Rech. s. valeur comparée des nitrates et des sels ammoniacaux comme aliment de la levure de bière et de quelqu. autres plantes (Ann. Inst. Pasteur 1889, **3**, 362).

4) Üb. Atmungsfiguren bewegl. Bakt. (Zbl. f. Bakt. 1893, **14**, 833).

5) W. und OMELIANSKI, Über d. Einfl. organ. Nährstoffe auf d. Arbeit. der nitrifiz. Mikroben (ibid. II, 1899, **5**, 329/342). — Betrifft STUTZERS „Salpeterpilz".

6) Die mineralische Nahrung der niederen Pilze (I. Abhandlung, Sitzungsber. d. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturw. Kl. I, 1894, **103**, 554).

Die Amidosäuren und ihre Amide werden von Bakterien und Pilzen leicht verarbeitet; manche von ihnen dürfen als „Amidoorganismen" bezeichnet werden, da sie ihr optimales Wachstum bei Ernährung mit Amidokörpern erreichen. Wenigstens für Pilze ist festgestellt worden, daß dabei mit steigendem C-Gehalt der Nährwert der Amidosäuren zunimmt: Amidoessigsäure (Glykokoll) wirkt nur schwach; die Wirkung nimmt zu bei Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure; Leucin wirkt fast so stark wie Eiweißstoffe. Ähnliches dürfte auch für andere Mikroorganismen gelten. Tyrosin ist fast unlöslich in Wasser, so daß auch eine konzentrierte Lösung nur wenig Substanz enthält. Am beliebtesten sind Asparagin (ca. 2 % in Wasser löslich) und Asparaginsäure. Für Bakterien wurde Asparagin zuerst von Uschinsky[1]) angewandt.

Für *Saprolegnia* nahm Klebs (a. a. O.) bis 2 % Glykokoll oder Alanin, 0,05—2 % Asparagin, 0,005—0,4 % Glutamin und 0,005—2 % Leucin. Bei Kultur von Organismen, welche gegen Säuren empfindlich sind, muß nach Zusatz der freien zweibasischen Amidosäuren (Asparagin- und Glutaminsäure) neutralisiert werden. Von den Säureamiden kommt höchstens als gute N-Quelle Acetamid in Betracht.

Die Körper der Harnstoff- und Harnsäuregruppe sind im allgemeinen ungenügende N-Quellen; doch gibt es unter Pilzen und Bakterien eine Reihe von Formen, die jene N-Verbindungen akzeptieren.[2]) Die wichtigsten Harnstoffverzehrer, die „Urobakterien", kommen mit Harnstoff als einziger Stickstoffquelle aus, beanspruchen aber gleichzeitig gute Kohlenstoffernährung (Beyerinck[3])).

Pepton, Albumosen und Albumine schließen die Reihe. Pepton vor allem ist ein in der bakteriologischen Technik unentbehrliches Hilfsmittel. Die im Handel erhältlichen Peptone unterscheiden sich zwar als ungleichartige Gemische verschiedenartiger Eiweißkörper mehr oder weniger voneinander; doch ist der Umstand für die Praxis der Organismenzüchtung wohl meist ohne Belang.[4]) Am beliebtesten ist das „Pepton Witte".[5]) Das bei Bakteriologen beliebte Peptonwasser stellt eine 1 %ige Lösung von Pepton dar. Als „Peptonorganismen", welche ihr optimales Wachstum bei Peptonernährung erreichen, lassen sich verschiedene Bakterien (Milchsäurebakterien u. a.) sowie die aus Flechten isolierten Algen bezeichnen.

---

1) Üb. eiweißfreie Nährlösung f. pathogene Bakt. (Zbl. f. Bakt. 1893, **14**, 316).

2) Czapek a. a. O. **2**, 104.

3) Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien usw. (Zbl. f. Bakt. II, 1901, **7**, 33, 37).

4) Analysen bei Butkewitsch, Umwandl. d. Eiweißstoffe durch d. nied. Pilze usw. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1903, **38**, 147) und Wherry in Journ. inf. dis. 1905, **2**, 436.

5) Von Friedrich Witte (Rostock i. M.). — Französische Autoren bevorzugen oft „Pepton Chapoteau". Vergleichende Untersuchungen über verschiedene Peptone (Martin, Defresne, vegetabilisches Pepton) bei Dunschmann (C. R. Acad. Sc. Paris 1908, **146**, 999).

Zahlreiche Versuche mit sogen. unlöslichen Eiweißstoffen stellte KLEBS[1]) an (Fibrin, Syntonin, Pflanzenglobulin, Globulin, Vitellin, Kasein u. a.). In kochendem Wasser gehen hinreichende Quanten von ihnen in Lösung, so daß die Organismen deutlich von ihnen beeinflußt werden. Mit Glutin oder Gelatine, welche nach KLEBS[2]) selbst in der Verdünnung von 0,001 noch als Nährlösung in Betracht kommt und auf Pilze sehr günstig einwirkt, mit Elastin, Chitin u. dgl., die nur in untergeordnetem Grade als Nährstoffe wirken können, mit den Albuminlösungen, welche viele pathogene Organismen beanspruchen, finden wir bereits den Abschluß an die flüssigen Nährböden von unbekannter Zusammensetzung.

Die von HEYDEN[3]) gelieferte Albumose (Heydennährstoff) ist seit NIEDNER und HESSE[4]) (z. B. in 0,75 %iger Konzentration) oft mit Erfolg benutzt worden. Somatose und Nutrose wurden von *Glaessner* vom bakteriologischen Standpunkt aus geprüft[5]). Auch Tropon ist verwertbar. Protogen erhält man aus Hühnereiweiß durch Formalinzusatz.[6]) Über Alkalialbuminate und ihre Verwendung hat besonders DEYCKE[7]) ausführliche Mitteilungen veröffentlicht.

Kombination der Nährstoffe. Es gibt, wie wir bereits anführten, eine Reihe von organischen N-Verbindungen, welche den Organismen C und N gleichzeitig bieten, so daß eine Kombination von mehreren organischen Nährstoffen nicht erforderlich ist; die organischen Ammoniumsalze, Asparagin und andere Amidokörper, auch Harnstoff, ferner Pepton u. dgl. gehören hierher. Doch ist bei der Verabfolgung solcher Stoffe zu prüfen, ob die zur Untersuchung vorliegenden Organismen vielleicht besser gedeihen, wenn C und N in besonderen Verbindungen ihnen geboten werden.[8]) Im allgemeinen wird man bei der Herrichtung einer Nährlösung ein Kohlehydrat oder der-

1) Zur Physiol. d. Fortpflanzung einiger Pilze II (Jahrb. f. wiss. Bot. 1899, **33**, S.-A. 79).

2) a. a. O., 78; vgl. auch RACIBORSKI, Über d. Einfl. äußerer Beding. auf d. Wachstumsweise v. *Basidiobolus* (Flora 1896, **82**, 109).

3) Laboratorium HEYDEN (Radebeul).

4) Vgl. z. B. HESSE u. NIEDNER, Die Methodik der bakteriol. Wasseruntersuch. (Zeitschr. f. Hyg. 1898, **29**, 454); MÜLLER, P., Über die Verwendung des von HESSE u. NIEDNER empfohl. Nährbodens bei d. bakteriol. Wasseruntersuch. (Arch. f. Hyg. 1900, **38**, 350) u. a.

5) Über die Verwertbarkeit einiger neuer Eiweißpräparate zu Kulturzwecken (Zbl. f. Bakt. 1900, **27**, 724).

6) Vgl. LOBOSCHIN, E., Stud. über die Verwendbarkeit eines neuen Eiweißkörpers für bakteriol. Kulturzwecke (Dissertation, Freiburg i. S.; vgl. Ref. im Zbl. f. Bakt. I, 1897, **25**, 391).

7) Die Benutzung v. Alkalialb. z. Herstellung v. Nährböden (Zbl. f. Bakt. 1895, **17**, 241); D. u. VOIGTLÄNDER, Stud. üb. kulturelle Nährb. (ibid. I, 1901, **19**, 617). Alkalialbuminate nach DEYCKES Rezept liefert als leichtlösliches Pulver E. Merck (Darmstadt).

8) Vgl. z. B. BEYERINCK, Zur Ernährungsphysiol. d. Kahmpilzes (Zbl. f. Bakt. 1892, **11**, 68).

gleichen und gleichzeitig eine N-haltige Verbindung verabfolgen. Dabei ist zu beachten, daß der Nähreffekt, den eine Substanz erzielt, ebensosehr wie von ihrem chemischen Charakter auch von der Reaktionsfähigkeit des kultivierten Organismus ihr gegenüber abhängt, und daß diese mit den verschiedensten Faktoren, namentlich auch mit den übrigen dargebotenen Stoffen, wechselt: die besten Stickstoffquellen bringen ihre Nährwirkung erst zur Geltung, wenn gleichzeitig eine geeignete C-Quelle geboten wird; es kann ferner das Stickstoffbedürfnis der Organismen durch die Art der C-Ernährung verändert werden[1]): der Nährwert einer Substanz kann durch andere Stoffe gehoben oder gedrückt werden. Merkwürdig ist, daß minimale Nährstoffspuren, die zunächst keine Reaktion seitens des Organismus mehr auslösen, es doch noch tun, wenn der Lösung sehr geringe Dosen von „Giften" zugefügt werden. Dazu kommt, daß das Verhalten eines Organismus gegenüber den Kohlenstoffquellen nicht artcharakteristisch ist, sondern mit andern äußeren Umständen, z. B. mit der Temperatur, wechselt.[2]) Besondere Komplikationen geben sich weiterhin in den Beziehungen zwischen Nährstoffmischung und formativen Effekten kund.[3]) Über alle diese Punkte, die für die Erforschung der Organismen und für Fragen der allgemeinen Physiologie, ebensosehr aber für die Praxis der Mikrobenzüchtung von größter Bedeutung sind, lassen sich vorläufig noch keine allgemeinen Regeln aufstellen und nur von Fall zu Fall durch gewissenhaftes Ausprobieren Aufschlüsse gewinnen.

Das letztere gilt auch für die Veränderungen, die eine Nährlösung während der Entwicklung erfährt: es ändert sich nicht nur ihre quantitative Zusammensetzung, sondern auch ihre qualitative. Wegen des ersten Punktes sei auf die zuerst von Pfeffer[4]) studierte Erscheinung des elektiven Stoffwechsels verwiesen: aus einem Nährmedium, welches z. B. mit Traubenzucker und Glyzerin zwei vortreffliche C-Quellen enthält, entnehmen manche Pilze fast nur den ersteren; das Glyzerin wird durch die Glukose „geschützt". Die verschiedensten Organismen verfahren mit derselben Elektion auch stereoisomeren Verbindungen (z. B. d = Weinsäure und l = Weinsäure) gegenüber. Qualitative Änderungen in der Zusammensetzung der Nährlösung werden z. B. bedingt durch die mannigfaltigen, in die Nährlösung diffundierenden Stoffwechselprodukte der Organismen (s. u.).

c) Organische Lösungen von unbekannter Zusammensetzung.

Flüssigkeiten, welche wie Milch oder Harn unmittelbar von der Natur geliefert werden, oder die als Dekokte irgendwelcher tierischen oder pflanzlichen Stoffe gewonnen werden, stellen fast immer höchst komplizierte Lö-

---

1) Vgl. z. B. Beyerinck, Über die Arten der Essigbakterien (ibid. II, 1898, **4**, 209).

2) Thiele, Temperaturgrenzen der Schimmelpilze. Dissertation, Leipzig 1896.

3) Vgl. z. B. Klebs, Zur Physiol. der Fortpfl. einiger Pilze. I.: *Sporodinia grandis* (Jahrb. f. wiss. Bot. 1898, **32**, S.-A. 36).

4) Üb. Elektion organ. Nährstoffe (Jahrb. f. wiss. Bot. 1895, **28**, 215).

sungen vieler anorganischer und namentlich organischer Verbindungen dar, und viele der letzteren lassen sich chemisch überhaupt noch nicht näher präzisieren. Derartige Lösungen sind zu den besten Nährmedien für Pilze, Bakterien usw. zu rechnen.

Bei der Wahl der Naturobjekte, die als Nährlösungen verwendet oder zu solchen verarbeitet werden sollen, steht dem Forscher natürlich ein unbegrenzt weites Feld offen; wir nennen im folgenden nur einige von denjenigen, die sich vielseitig bewährt haben und besonders leicht zu erhalten sind:

Fleischwasser. — Man verrührt 500 g fettfreies gemahlenes Rindfleisch[1]) in 1 l destill. Wasser und läßt die Mischung 12—24 Stunden kühl stehen. Dann läßt man die Flüssigkeit durch ein Leinentuch ablaufen. Fleischwasser reagiert sauer. — Eine Methode, mit schwach alkalischen Lösungen (NaOH) die Albumine des Fleisches aufzuschließen, hat BERTHELOT beschrieben.[2]

Bouillon. — Man löst in 100 g Wasser etwa 1 g LIEBIGS Fleischextrakt. Die braune Lösung reagiert sauer und kann ohne weiteren Zusatz oder nach Zusatz von Pepton, Zucker oder anderem als Nährlösung verwendet werden. — Über die Zusammensetzung der verschiedenen Fleischextraktpräparate (CIBIL, LIEBIG, AMOUR u. a.) vgl. KÖNIGS Handbuch.[3]) Empfehlenswert für Kulturen sind die peptonreichen Präparate („Pepton-Fleischextrakte") von Dr. KOCH, KEMMERICH u. a. Auch MAGGIS „gekörnte Bouillon", die Bouillonwürfel verschiedener Firmen u. ähnl. tun gleiche Dienste.

Milch. — Für Kuhmilch wird folgende Zusammensetzung angegeben:

Wasser	88 %
Kasein	3 %
Albumin	0,3 %
Butter	3,5 %
Milchzucker	4,5 %
Kalziumphosphat u. a.	0,7 %[4])

1) Das Fleisch bereits gehackt oder gemahlen zu kaufen ist wegen der Konservierungsmittel, die dem Fleisch gelegentlich zugesetzt werden, nicht zu empfehlen. Natriumsulfit erkennt man event. nach Zusatz von 25 % Schwefelsäure an der Bildung von schwefliger Säure; Fleisch, in dem man Borsäure vermutet, kocht man mit verdünnter Salzsäure, das Fleischwasser gibt ev. auf Kurkumapapier Rotfärbung, die auch nach dem Trocknen bestehen bleibt.

2) BERTHELOT, A., Préparation des milieux de culture par l'hydrolyse alcaline menagée des substances albuminoïdes naturelles (C. R. Soc. Biol. 1912, **68**, 757).

3) Die menschl. Nahrungs- u. Genußmittel, 3. Aufl., 1903, **2**, 169ff.

4) Die Analyse gibt keine Vorstellung von der Kompliziertheit dieser Nährlösung. SÖLDNER (Die Salze der Milch, Landwirtschaftl. Versuchsstat. **35**, 354) findet in 1000 Teilen Milch

Chlornatrium	0,962 g	Magnesiumzitrat	0,367 g
Chlorkalium	0,830 „	Dikalziumphosphat	0,671 „
Monokaliumphosphat	1,156 „	Trikalziumphosphat	0,806 „
Dikaliumphosphat	0,835 „	Kalziumzitrat	2,133 „
Kaliumzitrat	0,495 „	Kalziumoxydan Kasein	0,465 „
Dimagnesiumphosphat	0,336 „		

Durch anhaltendes Erhitzen bis zur Siedetemperatur werden nicht nur die in der Milch enthaltenen oxydierenden Fermente zerstört, sondern sie wird auch sonst in ihrem chemischen Charakter geändert: das Albumin gerinnt, der Kaseïn scheidet sich zum Teil als unlöslich aus. — Die Reaktion der Kuhmilch ist wechselnd (schwach sauer oder alkalisch oder amphoter).

Peptonisierung der Milch bzw. ihres Albumingehaltes erreicht O. JENSEN[1]) durch 24—48stündige Behandlung mit 1—2‰ Pepsin (*Pepsin. german. pur. granul.*) und 3,3‰ HCl. Peptonisierte Milch ist im allgemeinen klar; etwaige leichte Trübungen schwinden nach dem Neutralisieren oder können durch Abziehen mit einem Eiweiß und durch Filtrieren beseitigt werden.

Eier. — Der Inhalt der Eier, aus Eiweiß und Dotter bestehend, enthält in ersterem außer Salzen (Chlornatrium, Chlorkalium) vor allem Ovalbumin und Globuline, im Dotter vor allem Vitelline und Lecithalbumine. Das Eiweiß, welches von keratinösen Häutchen durchsetzt ist, muß man durch ein Tuch pressen, wenn man diese beseitigen will. Für die Praxis kommt in erster Linie das Hühnerei in Betracht. Vorschriften, seinen flüssigen Inhalt noch in seiner natürlichen Eischalenumhüllung als Nährboden zu verwenden, und Angaben über aseptisches Öffnen usw. bei HÜPPE und GÜNTHER.[2])

Harn.[3]) — Normaler Harn des Menschen reagiert sauer. Er enthält von anorganischen Verbindungen hauptsächlich Chlornatrium, Chlorkalium, verschiedene Phosphate (K, Na, Ca, Mg) und Sulfate, an organischen vor allem Harnstoff (bis 3,2 %), hiernach Harnsäure, Hippursäure, Allantoin, verschiedene Farbstoffe u. v. a. Hippursäure, die im menschlichen Harn nur in geringen Mengen vorliegt, ist im Herbivorenharn reichlicher. Harn als Nährlösung wird sich wohl in vielen Fällen auch durch eine wässerige Lösung von ca. 3 % Harnstoff ersetzen lassen.

Pflaumensaft. — Unter den Lösungen pflanzlichen Ursprungs ist der Pflaumensaft besonders beliebt. Man läßt $^1/_4$—$^1/_2$ kg in einem Liter Wasser 24—48 Stunden wässern, die entstandene Flüssigkeit wird filtriert und nach Bedürfnis eingedickt. So erhält man völlig klaren Saft. Legt man auf besondere Klarheit keinen Wert, so zerkocht man die Pflaumen und filtriert den Brei ein- oder zweimal durch Watte, hiernach durch Filtrierpapier. — Ähnlich verfährt man mit Dattelsaft und ähnlichen Extrakten.

1) Der beste Nährboden für die Michsäurefermente (Zbl. f. Bakt. II, 1898, **4**, 196); KAYSER, Etudes s. la fermentation lactique (Ann. Inst. Pasteur 1894, **9**, 737).

2) Einführ. in das Stud. der Bakteriol. 6. Aufl. Leipzig 1906, 211.

3) HELLER, Der Harn als bakteriol. Nährboden (Berl. klin. Wochenschr. 1890, **39**, 839); BROSTON, L. N., Cultivation of the *Aspergillus* in urine (Philadelphia med. journ. 1901, 446) u. a.

Bierwürze. — Bierwürze ist vor allem reich an Kohlehydraten (Maltose); sie wird von Brauereien bezogen. Hefen u. a. wachsen in gehopfter Bierwürze vortrefflich; manche Bakterien und Pilze werden aber durch das Hopfenharz in ihrer Entwicklung aufgehalten; für sie empfiehlt sich ungehopfte Würze.

Malzextrakt liefern verschiedene Firmen; ich bediente mich wiederholt mit gutem Erfolg des von Gebr. PATERMANN (Steglitz) gelieferten „Biomalzes" (1 Teil mit ca. 30 Teilen Wasser verdünnt). Das Präparat enthält:

Wasser	40.72 %
Zucker (auf Maltose berechnet)	48.26 „
Dextrin	7.23 „
Stickstoffsubstanz	2.75 „
Mineralstoffe	1.04 „
darunter Phosphorsäure	0.575 „
Kalk	0.360 „
Eisen	0.025 „

Auch versuche man Porter und ähnliche substanzreiche Biere, die man nötigenfalls durch Kochen entgeistet.

Most ist für viele Hefen, Schimmelpilze und andere Mikroorganismen ein vorzüglicher Nährboden. WORTMANN[1]) benutzte eingedickten Most italienischer Trauben, der sich in einer konzentrierten Form auch ohne Sterilisation beliebig lange hält und vor dem Gebrauch nur mit dem drei- bis fünffachen Volumen Wasser verdünnt zu werden braucht. Gute Resultate erzielte ich wiederholt mit sterilisiertem Most von der Wormser Firma „Nektar", die auch sterilisierte Obstsäfte als sehmackhaftes alkoholfreies Getränk in den Handel bringt.[2])

Sirup, Himbeersaft und Honig — hinreichend mit Wasser verdünnt — geben für Pilze gute Nährböden ab. —

Vorzüglich brauchbare organische Nährlösungen von unbekannter Zusammensetzung gewinnt man ferner durch kaltes Extrahieren oder durch Auskochen der verschiedensten, meist vegetabilischen Stoffe. Infuse von Heu sind gute Nährböden für Protozoen und Bakterien, Dekokte von Kartoffeln, Mohrrüben, Maiskörnern, Erbsen, Getreidekörnern, Stroh usw. dienen vornehmlich zur Kultur von Bakterien und Pilzen, weiterhin arbeitet man

---

1) Mitteilung über die Verwendung von konzentriertem Most für Pilzkulturen (Botan. Ztg. II, 1893, **51**, 177). WORTMANN empfiehlt den von Favara e Figli (in Mazzaro del Vallo) bezogenen eingedickten sizilischen Most, mit welchem auch BACHMANN (Einfluß der äußeren Bedingungen auf die Sporenbildung von *Thamnidium elegans* LINK. Botan. Ztg. I, 1895, **53**, 107, 120) mit gutem Erfolg arbeitete.

2) Ges. z. Herstellung alkoholfreier Weine, Meilen am Zürichsee (Filiale Nektar, Worms a. Rh.) liefert Trauben-, Apfel-, Birn-, Heidelbeersaft. — Ähnliche für uns verwendbare Produkte sind auch von zahlreichen andern Firmen zu beziehen.

je nach Bedürfnis mit Dekokten von Gartenerde, Lehm, Torf, Mist, Fischen, altem zersetzten Holz, Rosinen, allen möglichen süßen und sauren Früchten, Lösungen von Kindermehlen[1]) usw. usw. Über die chemische Zusammensetzung dieser Nährlösungen ist nichts näheres bekannt, über ihre Verwendbarkeit bei Kultur dieser oder jener Organismen wird im Speziellen Teil noch einiges zu sagen sein.

2. Feste Nährböden.

Es versteht sich bei den Ansprüchen der Lebewesen an Wasser von selbst, daß auch die Nährböden, die herkömmlich als „fest" bezeichnet werden, mehr oder minder reichlich Wasser enthalten. Wenn von festen Nährböden im Gegensatz zu den flüssigen die Rede ist, denkt man in erster Linie an wasserreiche, gallertartige Substanzen, an Hydrogele — zumeist organischen Ursprungs. Die Rolle, welche sie in der mikrobiologischen Technik spielen, darf einzig in ihrer Art genannt werden; wir müssen daher insbesondere dieser Gruppe von Nährböden nachher eine ausführliche Schilderung widmen.

Worin beruht die Bedeutung der festen Nährböden für die Technik der Mikrobenkultur? Vor allem darin, daß die ausgesäten Mikroorganismen nicht die Möglichkeit haben, sich in dem Nährmedium zu verbreiten, wie bei Anwendung einer Nährlösung, sondern an die Stelle gebannt bleiben, an welcher sie zur Aussaat kamen. Tritt lebhafte Vermehrung ein, so entstehen Häufchen, Platten, Tröpfchen oder „Kolonien" von anderer Gestalt, die am Rande fortwachsend immer mehr sich vergrößern und schließlich mit benachbarten Kolonien zusammentreffen und sich vereinigen können. Solche Kolonien stellen oft ungeheure Ansammlungen von Organismen auf engem Raum dar, und die gedrängte Nähe, in der sich die Organismen befinden, bringt manche Übelstände für diese mit sich, die caeteris paribus bei Anwendung flüssiger Nährböden sich nicht geltend machen. Es wird daher notwendig sein, bei der Erforschung eines Organismus flüssige und feste Nährböden anzuwenden und zu prüfen, auf welchen sich optimales Wachstum erzielen läßt, und ob wir bei den einen oder den anderen gewisse Eigentümlichkeiten der Organismen leichter erkennen können. Bei der Prüfung fester und flüssiger Nährböden wird sich herausstellen, daß die Wachstumserscheinungen auf diesen und jenen sich nicht nur graduell unterscheiden, sondern oft auch Qualitätsunterschiede erkennen lassen. Wodurch diese eigentlich bedingt und wodurch der feste Nährboden im einzelnen Falle besonders wirksam wird, ist meist schwer zu sagen; zunächst wird an den Einfluß der Gas- und Hydrodiffusion zu denken sein, die im festen Nährboden selbstverständlich langsamer und unvollkommener sich abspielen als im flüssigen; ferner wird der mechanische Widerstand, den der feste Boden den Organismen entgegensetzt, in Rechnung zu ziehen sein.

---

1) Diese enthalten neben Gramineen- oder Leguminosenstärke eingedampfte Milch.

Es dürfte sich empfehlen, die verschiedenen festen Nährböden in drei Gruppen unterzubringen: das für die Organismenkultur unentbehrliche Wasser liegt bei den Beispielen aus der ersten Gruppe zwischen festen, in Wasser unlöslichen, meist mineralischen Teilchen, — bei der zweiten handelt es sich um gallertartige Nährböden, die mit Wasser oder irgendeiner Nährlösung hergestellt werden, — bei den letzten um irgendwelche Substanzen tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, die entweder frisch, d. h. mit ihrem natürlichen Wassergehalt schon fertige Nährböden darstellen oder noch der Benetzung mit Wasser oder mit irgendeiner Nährlösung bedürfen. Wir unterscheiden demnach starre, gallertige und organisierte Nährböden.

a) Starre Nährböden.

Bei den Nährböden, die wir als starre bezeichnen wollen, handelt es sich um feste, meist mineralische, in Wasser unlösliche, aber von Wasser umflossene Partikel: benetzter Sand ist ein starrer Nährboden.

Nährsubstrate dieser Art haben den Vorzug, daß das Mittel, das dem Nährboden seine Festigkeit gibt, nur physikalisch wirkt und als chemisches Agens gar nicht — oder so gut wie gar nicht — in Betracht kommt. Die Flüssigkeit, die wir zwischen die Partikel bringen, wählen wir je nach Bedürfnis aus der Reihe der anorganischen und organischen Nährlösungen; chemisch wird der betreffende Organismus nur von ihr beeinflußt.

Sand ist das einfachste Material, aus dem man sich „starre Nährböden" herstellen kann. Man wäscht Sand mit viel Wasser gründlich aus, bis er auch beim Umrühren keine Trübung mehr gibt, glüht ihn aus und füllt ihn in geeignete Kulturgefäße, in welchen er mit Nährlösung benetzt wird. Die umständlichen Reinigungsprozeduren erspart man sich bei Benützung von gereinigtem Quarzsand oder Seesand, wie ihn Merck-Darmstadt liefert.

Auf Sand wachsen namentlich viele Algen sehr gut; in feuchten Sand eingebettet bringt man Sklerotien *(Peziza, Coprinus)* zur Fruchtbildung u. dgl. m.

Gipsplatten oder -scheiben, die man durch Anrühren von etwa gleichen Teilen Gipspulver und Wasser und Ausgießen der Teigmasse über eine Glasplatte oder in eine Schale von geeigneter Form sich herstellt, können nicht mehr als chemisch indifferent gelten, da sich Kalziumsulfat mit ca. 0,1 % in Wasser löst[1]); sie haben den großen Vorteil, daß bei ihnen eine glatte Oberfläche zum Aussäen und Beobachten der Organismen zur Verfügung steht. Man tut am besten, die Größe der Gipsplatten ein gut Teil kleiner als die des betreffenden Kulturgefäßes einzurichten; man schüttet dann das Wasser, die anorganische oder organische Nährlösung, mit der je nach Bedürfnis der Gips durchtränkt werden soll, so hoch ein, daß die Gipsscheibe oder der Gipsblock etwa mit der Hälfte ihrer Höhe in der Flüssigkeit stehen.

---

1) Gips enthält neben anderen Verunreinigungen auch etwas Mg und Fe.

Auf Gips sind Hefen und Bakterien erfolgreich kultiviert worden; auch eignet er sich für Kultur von Algen. Will man Kolonien hellfarbiger Organismen auf Gipsplatten gut sichtbar machen, so reibt man ihn ein wenig mit Graphit ein.

Tonplatten, z. B. Scherben von Blumentöpfen, geben hinreichend benetzt gute Nährböden für Algen u. a. ab. Gelegentlich sind auch bereits eigens geformte Tonwürfel, Ziegelsteine, Schamotteplatten, Bruchstücke von solchen und ähnliche Körper, die ihrer ebenen Oberfläche wegen sich empfehlen, zur Anwendung gekommen. Auch Trümmer von Chamberlandschen oder ähnlichen Porzellanfiltern (s. u.) lassen sich verwenden.

Poröse Gesteine, wie Kalkstein, Bimsstein u. dgl., dürften für bestimmte Zwecke brauchbar sein. Auch benetztes Kieselguhr und Gesteinspulver sind bereits verwendet worden.

Schwämme sind leicht mit Nährlösungen zu durchtränken und gleichzeitig einer kräftigen ständigen Durchlüftung zugänglich.

b) Gallertige Nährböden.

Daß zwischen flüssigen und sogen. festen Nährböden keine scharfe Grenze besteht, macht am besten die Betrachtung der kolloidalen Nährmedien klar. Lösungen von Gummi, Gelatine, pflanzlichen Schleimen u. a. sind vielfach als Nährsubstrate für tierische und pflanzliche Organismen benutzt worden und stellen ihrer Viskosität wegen eine besondere Gruppe der Nährlösungen dar. Es ist nun eine bemerkenswerte Eigentümlichkeit der kolloidalen Lösungen, daß sie bei hinreichend hoher Konzentration spontan oder nach Zusatz bestimmter Stoffe erstarren: aus der wässerigen Lösung oder dem Hydrosol entsteht eine wasserhaltige Gallerte oder ein Hydrogel.

Die „festen Nährböden" par excellence sind nun solche Hydrogele. Zu den Vorzügen, die den festen Nährböden im allgemeinen eigen sind, kommt für die Hydrogele noch der Umstand in Betracht, daß sie durchscheinend und klar sind und sich nach Belieben in alle beliebigen Formen der Kulturgefäße gießen lassen. Ferner sind die Hydrogele chemisch und physikalisch homogen herzustellen, d. h. wir können dafür sorgen, daß die gallertigen Nährböden in allen ihren Teilen gleichmäßig durchmischt den Organismen dieselben Nährstoffe darbieten, und daß ebenso auch die Konsistenz in ihnen dieselbe ist, während bei den organisierten festen Nährböden es sich um Massen handelt, die den Organismen sozusagen auf Schritt und Tritt wechselnde Lebensbedingungen bieten. Diese bedeutsamen Vorzüge sichern den Hydrogelen eine besondere Bedeutung in der Mikrobiologie, und damit, daß Koch[1]) 1881 zeigte, wie man auf künstlich leicht herstellbaren festen, durchsichtigen Medien Mikroorganismen züchten könnte, hat er insbesondere der wissenschaftlichen Bakteriologie einen unschätzbaren Dienst geleistet. Die

1) Zur Untersuchung von pathogenen Organismen (Mitteil. Kais. Ges.-Amt 1881, 1, 1.)

durchsichtigen Gallerten, die seit KOCH überall im Gebrauch sind, werden dem Forscher viel weniger durch ihren chemischen Einfluß auf die Organismen wertvoll, oder durch die oben erwähnten physikalischen Agentien, welche das Wachstum der Organismen auf festem Boden anders ausfallen lassen als auf flüssigem, — als vielmehr dadurch, daß die Technik der Organismenuntersuchung und namentlich der Reinkultur durch ihre Anwendung außerordentlich erleichtert und in vielen Punkten erst möglich gemacht wird.

Es gibt anorganische wie organische Hydrogele — beide kommen für unsere Zwecke in Betracht.

1. Anorganische Hydrogele.

Die Kieselsäuregallerte ist dasjenige anorganische Hydrogel, das als Kultursubstrat Verwendung gefunden hat. Ihre Vorzüge sind folgende: sie enthält an sich ebensowenig wie etwa Seesand u. dgl. Substanzen, die als Nährmaterial anzusprechen wären; alle nährende Substanz muß erst in Form beliebig variierbarer Lösungen zugesetzt werden; die chemische Zusammensetzung der Gallerte selbst ist konstant, so daß diese bei Anwendung einer anorganischen oder organischen Nährlösung von bekanntem Substanzgehalt Böden von leicht kontrollierbarer Zusammensetzung liefert. Die organischen Hydrogele gleichen den organischen Lösungen unbekannter Zusammensetzung darin, daß sie eine schwer kontrollierbare Kombination komplizierter organischer Verbindungen in wechselnder Zusammensetzung enthalten; sie geben an sich bereits kein indifferentes Kultursubstrat ab, sondern enthalten Stoffe, die als Nährstoffe wenigstens in Betracht kommen können. — Zu den nachteiligen Eigenschaften der Kieselsäuregallerte gehört es, daß sie nicht ganz mühelos herzustellen ist.

Methoden zur Herstellung der Kieselsäuregallerte finden sich in chemischen Handbüchern angegeben sowie in den Publikationen verschiedener Bakteriologen, für welche dieser anorganische „feste" Nährboden seit der Entdeckung der Nitrifikationsbakterien durch WINOGRADSKY besondere Bedeutung gewonnen hat. Ich gebe zunächst die Methode an, welche in WINOGRADSKYS Laboratorium sich bewährt hat.[1])

Eine Mischung aus gleichen Teilen Wasserglas (spez. Gewicht 1,05 bis 1,06) und Salzsäure (spez. Gewicht 1,10) — letztere wird nach und nach zur Wasserglaslösung geträufelt — wird in Pergamentschläuchen dialysiert bis zum Verschwinden der Chlorreaktion. Kali- und Natronwasserglas sind gleich gut verwendbar, müssen aber rein und vollkommen klar sein; geht man von unreinem Material aus, so gerinnt später die Masse schon im Dialysator, oder man erhält zwar eine Lösung, aber diese hält Kochen und Sterilisieren nicht

1) OMELIANSKI, V., Über die Isolierung der Nitrifikationsmikroben aus dem Erdboden (Zbl. f. Bakt. II, 1899, **5**, 537, 541). Weitere Mitteilungen über die Herstellung der Kieselsäuregallerte bei KÜHNE, Kiesels. als Nährb. f. Organismen (Ztschr. f. Biol. 1890, **27**, N. F. **9**, 171); SLESKIN, Die Kieselsäuregallerte als Nährb. (Zbl. f. Bakt. 1891, **10**, 209) u. a.

aus, ohne zu erstarren. Opaleszierende Lösungen sollen nicht verwendet werden. Man versäume nicht, die Pergamentschläuche sorgfältig auf ihre Intaktheit zu prüfen. Die Dialyse beansprucht zwei Tage: den ersten dialysiert man gegen schnell fließendes Leitungswasser, den zweiten in destilliertem Wasser, das 3—4mal gewechselt werden soll. Von Zeit zu Zeit entnimmt man mit der Pipette eine Probe und prüft auf Chlor: wenn Silbernitrat gar keine oder nur eine leichte Trübung hervorruft, darf die Dialyse beendet werden. Die erhaltene Flüssigkeit wird in gut gereinigten, mit eingeschliffenen Stöpseln versehenen Flaschen aufbewahrt; große Vorräte herzustellen hat keinen Zweck, da bei längerem Stehen die Lösung zu opaleszieren beginnt und ihre guten Eigenschaften verliert. Hundert Teile eines solchen Präparates enthalten 2 Teile SiO_2, das spezifische Gewicht beträgt 1,0121 (16° C). Es verträgt zunächst sehr wohl Erhitzung bis zu 115—120° C (Autoklav); erst bei längerem Stehen geht diese Eigenschaft verloren. Zum Nährsubstrat wird diese Masse erst nach Zusatz irgendwelcher Salze. WINOGRADSKYS Kieselhydrosol gerinnt nach dem Salzzusatz in ungefähr einer Stunde, ohne daß vorher eingedickt würde. Wenn andere Autoren dünne, erst nach dem Eindicken erstarrende Sole erhielten, so erklärt sich nach OMELIANSKI der Übelstand daraus, daß jene durch Anwendung schadhafter Pergamentschläuche zuviel Kieselsäure beim Dialysieren verloren haben. — Die Gallerte ist keineswegs elastisch und reißt leicht. Sie scheidet zuweilen Wasser ab.

Ich lasse noch die Angaben STAHELS über Anfertigung von Kieselsäuregallerte folgen[1]):

Ein Teil Natriumwasserglaslösung (spez. Gewicht 1,09—1,10) und ein Teil Salzsäure (spez. Gewicht 1,10) werden gemischt, indem man die Wasserglaslösung in die Salzsäure gießt. Mit der Mischung werden zuverlässig dichte Pergamentschläuche (DESAGA-Heidelberg) von 50 mm Breite und 35 cm Länge gefüllt. Man fülle sie nur mit einem Drittel ihres Fassungsvermögens und schließe sie mit einer Schraubenklemme derart, so daß möglichst alle Luft aus ihnen entfernt wird. Dialysiert wird in einer Kuvette, in der die Schläuche horizontal auf einem Gestell von Holzstäben liegen (12 Stunden gegen schnellfließendes Brunnenwasser (etwa 4 l pro Minute), das von unten herkommt und oben abfließt; Temperatur 15°, nötigenfalls vorhergehendes Anwärmen des Wassers; dann 12 Stunden gegen 2—3mal erneuertes destill. Wasser; die Holzgestelle sind zu entfernen). Sind die Schläuche mit 100 cc der Mischung gefüllt, so enthält das Hydrosol schließlich etwa 0,01 % Kochsalz — dieser Gehalt beeinträchtigt die Haltbarkeit der Lösung nicht und entspricht gerade dem Kochsalzgehalt der WINOGRADSKYschen Lösung. Enthielten die Schläuche 200 cc, so resultiert ein Gehalt von 0,05 % NaCl. Bei der Dialyse permeïert Wasser in die Schläuche, so daß die anfänglich 100 cc

1) STAHEL, G., Stickstoffbind. durch Pilze bei gleichzeit. Ernähr. m. gebund. Stickst. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1911, **49**, 579). Vgl. auch STEVENS, F. C. a. TEMPLE. J. C., A convenient mode of preparing silicate jelly (Zbl. f. Bakt. II, 1908, **21**, 84).

enthaltenden nach der Dialyse 142 cc Sol, die mit 200 cc beschickten schließlich 280 cc enthalten. Das Hydrosol hat ein spez. Gewicht von 1,012 (auf 100 Teile Lösung 1,6 Teile Kieselsäure). Die Lösung ist schwach sauer und kann bis zu einem Jahre aufbewahrt werden, ohne zu koagulieren oder ihre gallertbildenden Eigenschaften zu verlieren. 18 cc des Hydrosols werden mit 2 cc einer zehnfach normalen Nährlösung (ohne NaCl) gemischt und in Platten gegossen. Koagulation tritt selbst nach vielen Tagen nicht ein; bei Sterilisation im Autoklaven (135°) (s. u.!) nimmt sie zähflüssige Konsistenz an.

Um feste Gallerte zu erhalten, brachte STAHEL wechselnde Mengen einer 4 %igen Aufschlämmung von Magnesiumkarbonat zu je 20 cc Nährlösung + Kieselsäure. Am passendsten erwies sich ein Zusatz von je $^1/_4$ cc der Aufschlämmung; die anfängliche Trübung der Mischung verschwindet wieder, und die Platten werden vollkommen klar. Sie müssen bei 90—95° C pasteurisiert werden (s. u.!).

2. Organische Hydrogele.

Die in diese Reihe gehörenden Nährböden übertreffen alle anderen an vielseitiger Verwendbarkeit und Beliebtheit. Ihre Zahl ist nicht groß, und von Bedeutung sind überdies nur zwei von ihnen: die Gelatine und der Agar-Agar. Material zur Herstellung beider Arten von Nährböden fehlt in keinem Laboratorium, in welchem die Mikrobiologie ihren Platz hat. Beide Nährböden haben ihre besonderen Vorzüge und Nachteile; sie können sich bei vielen, keineswegs bei allen Fragen gegenseitig ersetzen und müssen bei vielen Arbeiten in ihrer Wirkung auf die Organismen miteinander verglichen werden.

Gelatine. — Die wohlbekannte Speisegelatine ist ein aus Knochen gewonnenes Material und stellt einen durch reduzierende Mittel gebleichten Leim dar. Chemisch genommen ist sie als Glutin zu den eiweißartigen Verbindungen zu stellen. Für uns wird das Glutin dadurch wichtig, daß seine heiß hergestellten Lösungen beim Erkalten — hinreichend hohe Konzentration vorausgesetzt — zu einer durchsichtigen, elastischen Gallerte erstarren. Zur Kultur von Mikroorganismen wurde Gelatine zuerst von KOCH (a. a. O.) benutzt.

Gelatine enthält Stoffe, die bereits zur Ernährung von Organismen genügen, so daß auch auf reiner, mit destilliertem Wasser hergestellter Gelatine anspruchslose Pilze, Bakterien u. a. ihr Gedeihen finden. Im allgemeinen muß man aber der Gelatine irgendeine Nährlösung zusetzen. Man verfährt bei Herstellung einer Nährgelatine folgendermaßen:

Einige Blätter guter Gelatine[1]) werden in irgendeiner Nährlösung — Lösung anorganischer Salze oder organischer Verbindungen — heiß gelöst. Die Temperatur, bei welcher Gelatine erstarrt, steigt mit der Konzentration; man wähle diese in Rücksicht auf die Jahreszeit und auf den

1) Feinste Gelatine liefern z. B. HESTERBERG-Berlin, Deutsche Gelat.-Fabr.-HÖCHST a. M., E. MERCK-Darmstadt u. a.

Aufenthaltsort der beabsichtigten Kulturen: schwachprozentige Gelatinelösung — etwa 5 % — ist bei Zimmertemperatur (15° C) noch fest; will man die Kulturen bei hoher Temperatur (etwa 27—28° C) halten, so muß man die Gelatine 25 %ig herstellen; ihr Erstarrungspunkt liegt dann bei etwa 30° (ELSNER[1])); im allgemeinen bevorzugt man 8—10 %ige Gelatine. Hochprozentige Gelatine wird durch Wasserverlust leicht unbrauchbar.

In kochendem oder heißem Wasser löst sich Gelatine schnell: man setzt den Kolben mit Gelatine-Nährlösung ins Wasserbad über die Gasflamme oder in einen Dampftopf, in dem der Kolben von heißem Dampf umspült wird. Jedesmal aber, wenn Gelatine der Siedetemperatur des Wassers ausgesetzt wird, hat man sich daran zu erinnern, daß durch Kochen das Erstarrungsvermögen der Gelatine zurückgeht. Hat man Interesse daran, den Schmelzpunkt der Gelatine recht hoch zu erhalten, so vermeide man nach Möglichkeit alles unnötige Erhitzen (vgl. die Vorschriften von FORSTER[2])). Eingehende Untersuchungen über die Wirkung anhaltenden Kochens auf das Erstarrungsvermögen der Gelatine stellte v. DER HEIDE[3]) an. Es stellte sich heraus, daß eine Erwärmung auf 100 ° C pro Stunde durchschnittlich eine Erniedrigung des Erstarrungspunktes um 2° C herbeiführt. Für Gelatine, die nach einmaligem Erstarren einige Zeit aufbewahrt wird, beträgt die Erniedrigung pro Stunde $^1/_4{}^0$ weniger, für solche, die unmittelbar nach Aufschmelzung und Wiedererstarrung gebraucht wird, $^1/_4{}^0$ C mehr. Bei längerem Stehen gewinnt gekochte Gelatine ihre ursprünglichen Qualitäten zurück, d. h. ihr Verflüssigungspunkt steigt wieder und zwar um so höher, je mehr er vorher durch Kochen erniedrigt worden war. 10 %ige Gelatine hat somit nach zweistündiger Erwärmung auf 100° denselben Erstarrungspunkt wie 2 %ige, die noch gar nicht erwärmt worden ist. Bei Erhitzung über 100° C sinkt der Erstarrungspunkt der Gelatine rapid; das ist zu bedenken, wenn man Gelatine im Autoklav erhitzen will. — Weiterhin verliert die Gelatine ihr Erstarrungsvermögen nach Zusatz starker Alkalien oder Säuren. Dieser Umstand ist wohl zu beachten, wenn man die Gelatine z. B. mit stark sauer reagierenden Nährlösungen herstellt. Versuche, durch Beimengung von Formaldehyd eine hochschmelzende Gelatine zu erhalten, haben zu keinen befriedigenden Resultaten geführt.[4])

Die durch heiße Lösung gewonnene Gelatinemasse ist durchsichtig und zeigt nur eine schwache Trübung. Will man diese beseitigt wissen, so

1) Untersuch. z. Plattendiagnose d. Choleravibrio (Arch. f. Hyg. 1894, **21**, 140).

2) Nährgelatine mit hohem Schmelzpunkt (Zbl. f. Bakt. I, 1897, **22**, 341); vgl. auch die folgende Anmerkung.

3) Gelatinöse Lösungen und Verflüssigungspunkt der Nährgelatine (Arch. f. Hyg. 1897, **31**, 82); daselbst weitere Literaturangaben. Ferner GAEHTGENS, Einfl. hoher Temperaturen auf d. Schmelzpunkt d. Nährgelatine (ibid. 1905, **52**, 239).

4) Vgl. WESENBERG, G., Über die Erhöhung des Schmelzpunktes der Gelatine durch Formalinzusatz (Hygien. Rundschau 1902, 899).

kann man sich eines einfachen Klärungsverfahrens bedienen: der Gelatine wird das Weiße eines Hühnereies zu „Schnee" geschlagen zugesetzt. Beim Kochen koaguliert das Eiweiß und nimmt dabei zahlreiche der in der Flüssigkeit suspendierten Teilchen an sich. Man filtriert die Gelatine heiß durch Filtrierpapier, am besten mit Hilfe eines Heißwassertrichters (s. u. Fig. 1).

Gelatine reagiert sauer, — der Grad der Azidität zeigt allerdings bei den verschiedenen Sorten des Handels nicht unbeträchtliche Schwankungen. Will man auf der Gelatine Organismen züchten, die einen alkalischen Nährboden fordern, so muß man den Nährboden neutralisieren oder alkalisch machen. Dazu nimmt man konzentrierte Sodalösung oder ca. 5 %ige Natronlauge und probiert mit Lackmuspapier. Durch Kochen kann die alkalische Reaktion wieder schwinden und die saure wieder zur Geltung kommen.[1])

Bei manchen Versuchen dürfte es notwendig sein, die Verunreinigung gewisser Gelatinen mit Kalziumnitrat zu berücksichtigen. Man beseitigt diese nach Petri[2]), indem man Gelatine in destilliertem Wasser drei Tage im Eisschrank stehen läßt. Die Gelatine quillt dabei stark auf, die Nitrate gehen in Lösung. Petri konnte 0,13 % Salpetersäure nachweisen.

Schließlich ist noch zu erwähnen, daß Gelatine von Organismen verschiedenster Art durch Ausscheidung tryptischer Fermente verflüssigt wird. Bei Besprechung der für die Mikroorganismen charakteristischen Stoffwechselprodukte wird hierauf näher einzugehen sein.

Agar-Agar. — Im Gegensatz zur Gelatine ist dieser[3]) ein pflanzliches Produkt; er leitet sich von verschiedenen Rotalgen der ostasiatischen und malaiischen Küsten her, besonders von *Gelidium corneum*, außerdem *G. cartilagineum*, *Eucheuma spinosum*, *Gracilaria lichenoides* u. a., deren Membransubstanz in kochendem Wasser zu einer Gallerte sich umwandelt. Agar kommt in Form von nahezu farblosen häutigen Streifen oder zu Pulver gemahlen in den Handel.

Der Agar hat Kohlehydratnatur; er stellt vorzugsweise ein Gemisch von verschiedenen Polysacchariden dar, die durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure sich verzuckern lassen.[4]) Hinsichtlich seiner chemischen Wirkung auf die Organismen darf Agar im Gegensatz zur Gelatine als indifferent bezeichnet werden.

1) Einige Angaben hierüber bei Hesse, G., Beitr. z. Herstellung v. Nährböden u. z. Bakterienzüchtung (Ztschr. f. Hyg. 1904, **46**, 1).

2) Über den Gehalt der Nährgelatine an Salpetersäure (Zbl. f. Bakt. 1889, **5**, 457) und Nachtrag dazu (ibid. 679). Über den Nachweis von Chloridspuren in Gelatine vgl. Lüppo-Cramer in Ztschr. f. Chemie u. Ind. d. Koll. 1909, **5**, 249.

3) Über die ersten Benutzer der Agargallerte vgl. Hüppe, Methoden d. Bakterienforschung, 5. Aufl., 250, und Koch, Ätiol. d. Tuberk. (Mitteil. a. d. Kais. Ges.-Amt., 1884, **2**, 57).

4) Näheres und Literaturangaben bei Wiesner, Rohstoffe des Pflanzenreichs, 2. Aufl., Leipzig 1900, **1**, 646.

Zur Herstellung einer geeigneten Gallerte genügen bei ihm geringere Mengen als Gelatine; $^3/_4$ %iger Agar gibt nach Lösung in siedendem Wasser bereits eine Gallerte; meist nimmt man 1—1,5 %, selten mehr als 2 %. Die Gallerte, die 1,5 % Agarmasse enthält, ist bereits sehr derb. Geht man von Agarpulver aus[1]), so läßt sich im Wasserbad sehr schnell eine Lösung herstellen; nimmt man Agarstreifen, so schneidet man diese zunächst in kleine Stücke und läßt sie in Wasser oder Nährlösung erst einen Tag quellen. Geht das nicht an, so bringt man sie in der Nährlösung in den Dampftopf oder wenn möglich in den Autoklav (s. u.): bei einer Erhitzung auf 120° C gehen die Agarstückchen binnen 20 Minuten in Lösung.

Agar schmilzt erst bei ungefähr 100° C. Der Erstarrungspunkt liegt für 1%ige Agarlösung bei ungefähr 38—40° C; Kochen vermag ihr Erstarrungsvermögen nicht zu beeinflussen. Wohl aber wird Agar durch Zusatz allzu kräftiger Säuren oder Alkalien seines Erstarrungsvermögens beraubt. Namentlich nach Kochen bei mehr als einer Atmosphäre büßt stark saurer oder stark alkalischer Agar sein Erstarrungsvermögen völlig ein.[2]) Wie N. K. Schultz[3]) betont, stellt nachträgliches Neutralisieren die ursprünglichen Eigenschaften des Agars nicht wieder her. Daran ist zu denken, wenn man mit stark sauren Nährlösungen Agar herzustellen hat. Geringere Säuredosen zerstören das Erstarrungsvermögen nicht, sie machen den Agar aber dünnflüssiger und sind daher zur Vorbehandlung des Agars empfohlen worden, damit er besser durchs Filter läuft.[4])

Die Reaktion der Agarlösung ist meist schwach alkalisch.

Der hohe Erstarrungspunkt erschwert das Filtrieren der trüben Agarflüssigkeit. Wenn möglich, wird man sich damit begnügen, die Masse im Dampftopf (s. u. Fig. 3) möglichst lange flüssig zu erhalten und das Absetzen der suspendierten Teilchen abzuwarten. Wird Filtrieren unerläßlich, so arbeitet man mit Glaswolle, Watte, Flanell u. dgl. schneller, freilich nicht so gründlich, wie mit Filtrierpapier. Damit aber nicht die Masse erstarrt, bevor noch ein nennenswerter Teil von ihr durchs Filter gegangen ist, bediene man sich eines „Heißwassertrichters" (Fig. 1a): der das Filter haltende Trichter wird bei dieser Vorrichtung von einem Mantel heißen Wassers umgeben — oder man benutze Unnas „Dampftrichter"[5]) (vgl. Fig. 1b), der sogar die Anwendung von Temperaturen über 100° gestattet.

Den Mikroorganismen, welche Gelatine durch tryptische Fermente verflüssigen, widersteht Agar. Nur für einige wenige Organismen ist bisher festgestellt worden, daß sie Agar verflüssigen.

1) Gemahlenen Agar liefert z. B. E. Merck (Darmstadt).

2) Genaue Angaben bei Reidemeister, W., Üb. d. Einfl. v. Säure usw. Zusatz auf die Festigkeit des Agars (Ztschr. f. wiss. Mikr. 1908, **25**, 42).

3) Zur Frage von der Bereitung einiger Nährsubstrate (Zbl. f. Bakt. 1891, **10**, 58).

4) Vgl. z. B. Schottelius, Einige Neuerungen an bakteriol. Apparaten (ibid. 1887, **2**, 97).

5) Der Dampftrichter (Zbl. f. Bakt. 1891, **9**, 749). Das Instrument liefern z. B. Bauer & Häselbarth (Eimsbüttel bei Hamburg).

Auch ohne Zusatz von Nährlösung irgendwelcher Art vermag, wie bereits gesagt wurde, die Agargallerte bereits bescheidene Organismen zu ernähren. In der Tat enthält Agar geringe Beimengungen N-haltiger Verbindungen. Will man nun Organismen bei sicherem Ausschluß der unkontrollierbaren stickstoffhaltigen Verunreinigungen des Agars kultivieren, oder handelt es sich um Lebewesen, welche wasserlösliche organische Verbindungen nicht ertragen, so muß der Agar zunächst gereinigt werden. Häufig wird es genügen, die aufgequollenen Fäden in einen Gazesack einzubinden und unter der Wasserleitung berieseln zu lassen. In anderen Fällen muß man gründlicher vorgehen. Man gießt den Agar in flache Schalen, schneidet die erstarrte Schicht in schmale Bänder und bringt diese in großen Stöpselflaschen in destilliertes Wasser. Dieses zeigt bald starke Bakterienentwicklung als Zeichen für die aus dem Agar herausdiffundierenden Stoffe; es muß wiederholt erneuert werden, bis die Auslaugung beendet ist, und das aufgeschüttete Wasser keine Bakterienentwicklung mehr zeigt. Dann werden die Agarstreifchen von neuem zusammengeschmolzen und in der üblichen Weise weiterverarbeitet. Oder man gießt den heißen, noch ungereinigten Agar unmittelbar in die Dosen usw., in welchen die Kultur vorgenommen werden soll, und stellt jene nach Erstarren des Agars für mehrere Tage unter fließendes Leitungswasser. Die nötigen Nährsalze läßt man dann durch Diffusion in den Agar kommen, indem man eine geeignete Lösung über ihn ausschüttet und sie von Zeit zu Zeit erneuert. Legt man Wert auf eine „trockene" Agaroberfläche, so kann man durch Erwärmen das anhaftende Wasser zur Verdunstung bringen.[1])



Fig. 1a. Heißwassertrichter.



Fig. 1b. Dampftrichter.

1) Vgl. z. B. Beyerinck, Über Regeneration der Sporenbildung bei Alkoholhefen, wo diese Funktion im Verschwinden begriffen ist (Zbl. f. Bakt. II, 1898, 4, 663); Über oligonitrophile Mikroben (ibid. II, 1901, 7, 561).

Ein von WIESNER (a. a. O. nach MUSPRATT) angegebenes Verfahren der Agarreinigung wurde von KEDING[1]) folgendermaßen angewandt. Der Agar wird zunächst mit Salzsäure behandelt, in fließendem Wasser ausgewaschen, bis keine Cl-Reaktion mehr eintritt, und dann mit 1 %iger Kalilauge bedeckt. Das Auswaschen der Lauge geht sehr langsam vor sich und beansprucht mehrere Tage. Wenn die alkalische Reaktion geschwunden ist, wird noch 24 Stunden in fließendem Wasser gewaschen, mit destilliertem Wasser nachgespült, dann wird abgepreßt und getrocknet. Die bräunliche Masse ist so spröde, daß man sie im Mörser zu einem feinen Pulver verreiben kann. Ein Teil dieses gereinigten Agars, der fast nur noch Kohlehydrate enthält („Gelose"), gibt mit 100 Teilen Wasser eine feste Gallerte. — KEDING fand in gewöhnlichem Agar 3,9307 % Aschenbestandteile, in Gelose 1,8350 %, — in Agar 0,3009 % N, in Gelose 0,1056 %.

Eine Eigentümlichkeit des Agars besteht darin, daß er beim Erstarren etwas Wasser („Kondenswasser") ausscheidet, welches die Oberfläche des Nährbodens feucht erhält und durch Verbreitung der ausgesäten Keime von der Impfstelle über die ganze verfügbare Fläche zuweilen lästig werden kann.

	Gelatine	Agar-Agar
Ursprung:	tierische Gewebe	pflanzliche Gewebe
Chemischer Charakter:	eiweißähnlich	Kohlehydratnatur
Schmelzpunkt: (bei Verwendung der üblichen Konzentrationen):	ca. 25° C	über 40° C
Reaktion:	sauer	alkalisch
Verhalten gegen tryptische Fermente	wird verflüssigt	wird nicht verflüssigt
Kondenswasser:	fehlt	ist vorhanden.

Die Verunreinigung des Agars mit Diatomeen wird wohl nur Anfänger beim Durchmustern der Agarkulturen unter dem Mikroskop irreführen können. Man findet in Agar *Licmophora*, *Rhabdonema*, *Grammatophora*, *Stauroneis* und andere Formen; MARPMANN[2]) hat ein Verfahren beschrieben, nach welchem man sich schnell über den Diatomeenreichtum einer

1) Weitere Untersuch. üb. stickstoffbindende Bakterien (Wissensch. Meeresuntersuch., Abteil. Kiel, N. F. 1906, 9).

2) Über Agar-Agar und dessen Verwendung und Nachweis (Zeitschr. f. wiss. Mikr. 1896, 2, 257).

Agargallerte informieren kann. — Auch die Kristalle, die sich in trocknendem Agar bilden, können gelegentlich den Ungeübten irreführen.

Agar hat weiterhin die Eigentümlichkeit, nicht am Glas der Kulturgefäße zu haften — im Gegensatz zu Gelatine. Wenn dieser Umstand bei Benutzung des Agars stören sollte, hilft man sich durch Zusatz von Gummi arabicum oder Benutzung einer Agar-Gelatinemischung.

Agar-Gelatine-Kombinationen. — Agar und Gelatine lassen sich durch Mischung zu einer einheitlichen Gallerte vereinigen, die hier und da Anwendung gefunden hat; vor allem gelingt es, durch Zusatz von Agar zur Gelatine eine Art Tropengelatine herzustellen, deren Schmelzpunkt höher liegt als der der reinen Gelatine. PRALL[1]) z. B. mischt 5 % Gelatine und 0,75 % Agar.

Andere gallertige Nährböden. — Außer Gelatine und Agar ist noch eine Reihe anderer gallertiger Nährböden zu nennen, von welchen die Blutserumgallerte seit KOCH zu einem wichtigen Hilfsmittel der bakteriologischen Forschungen geworden ist, während andere nur gelegentlich Verwendung gefunden haben. Einige von ihnen sind chemisch wegen ihres Eiweißcharakters der Gelatine vergleichbar, andere stehen als Kohlehydrate dem Agar-Agar nahe.

Blutserum: Läßt man frisch aufgefangenes Blut vom Kalb, Hammel oder Pferd ruhig stehen, so setzen sich die geformten Bestandteile des Blutes mehr oder minder schnell ab und vereinigen sich durch das gerinnende Fibrin zum sogen. „Blutkuchen". Die darüberstehende klare Flüssigkeit, das Serum, dessen chemische Zusammensetzung zurzeit noch unübersehbar kompliziert ist, enthält außer vielen Salzen Eiweißstoffe, Kohlehydrate, Harnstoff, Farbstoffe u. a. m.; der Gehalt an Na_2CO_3 bedingt die alkalische Reaktion des Serums. Seine Verwendbarkeit für die Zwecke des Biologen erkannte zuerst KOCH.[2]) Beim Erhitzen auf 100°, ja schon bei 65—68° C erstarrt das Serum zu einer gallertigen Masse, die wegen ihres Gehalts an anorganischen Verbindungen, Eiweißstoffen usw. ohne weiteres für die verschiedensten Organismen — und auch für solche, welche auf anderen Böden kümmerlich oder gar nicht gedeihen wollen — einen vorzüglichen festen Nährboden abgibt. Legt man Wert auf die Durchsichtigkeit der Gallerte, so darf man nur auf ca. 68° C erhitzen (KOCH) oder muß Alkalien zusetzen[3]); andernfalls wird die Gallerte bei Erhitzen auf höhere Temperaturen undurchsichtig. Steriles

---

1) PRALL, FR., Beitr. z. Kenntnis der Nährböden für die Bestimmung der Keimzahl im Wasser (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh.-Amt., 1902, **18**, 436); PLAUT, Üb. eine neue Meth. z. Konserv. u. Weiterzüchtung v. Gelatinekulturen (Fortschr. d. Med. 1886, **4**, 419); WILFARTH, Üb. eine Modif. d. bakt. Plattenkulturen (D. med. Wochenschr. 1887, 618) u. a. m.

2) Die Ätiologie der Tuberkulose (Mitteil. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1884, **2**, 1).

3) COBBETT, Alkalinis. Rinder- u. Pferdeserum als Hilfsmittel bei d. Diphtheriediagn. (Zbl. f. Bakt. 1898, **23**, 395).

Blutserum wird von verschiedenen Firmen geliefert (z. B. R. ALTMANN, Berlin NW).

Einige weitere Gallertnährböden spielen nur eine untergeordnete Rolle.

Seidenleim erhält man dadurch, daß man rohe Seide einige Stunden lang in Wasser kocht. Der in Lösung gehende Teil ist das Serizin (Seidenleim), der unlösliche das Fibroin der Seide. CRAMER[1]) gibt für Seidenleim

44,32 % C,
6,18 % H,
18,30 % N

an. Eine 10 %ige Lösung der Substanz gibt beim Erkalten eine Gallerte, die MARPMANN[2]) als Nährboden für Bakterien und Pilze verwandt hat. Durch anhaltendes Kochen, durch Zusatz von Säure oder Alkali verliert der Nährboden sein Erstarrungsvermögen. — Bakterien, welche Gelatine verflüssigen, rufen auf Seidenleimgallerte dieselbe Erscheinung in sehr viel schwächerem Maße hervor (MARPMANN).

Stärkegallerte. — Verkleistert man ca. 30 % Stärke durch Kochen in Wasser, so entsteht eine derbe Gallerte, die schon von verschiedenen Autoren als Nährboden verwandt worden ist. E. SMITH[3]) gibt auf 3 g reiner Kartoffel-, Reis- oder anderer Stärke 10 ccm einer Nährlösung und setzt die Masse an 5—6 aufeinanderfolgenden Tagen je 2—3 Stunden einer Temperatur von 75—85° C aus. Die Stärke verquillt, und es entsteht eine „Stärkegallerte", die zur Kultur von Pilzen und Bakterien brauchbar ist.

Auch Lävulan (Anhydrit der Lävulose) und Lichenin sind gelegentlich verwendet worden.

Über eine Methode, sich aus Rotalgen eine Agarmasse herzustellen, berichtet MARPMANN.[4]) Die Thalli von *Sphaerococcus confervoides* werden in schwacher Salzsäure mazeriert und hiernach so lange gewaschen, bis keine Rotfärbung von Lackmus mehr eintritt.

Als Ersatz für Gelatine kann nach MARPMANN das Chondrin verwendet werden, welches man durch Auskochen der Rippenknorpel und Ohrmuscheln im PAPINschen Topf gewinnt. „Vor Gelatine haben diese Chondrinlösungen eine größere Festigkeit und ein langsameres Zerfließen durch peptonisierende Spaltpilze, sowie Festbleiben bis über + 30° C voraus."

Gelatine und Agar ohne weiteren Zusatz gestatten zwar, wie bereits erwähnt, vielen Lebewesen kümmerliches Wachstum. Zur Kultur der Organismen benutzt man aber beide Nährböden nur nach Zusatz irgendwelcher — anorganischer oder organischer — Nährstoffe. Alle Lösungen, die im vorangehenden Abschnitt aufgezählt worden sind, können durch Zusatz von Gelatine oder Agar zu „festen" Nährböden umgewandelt werden.

---

1) Über die Bestandteile der Seide (Journ. f. prakt. Chemie 1865, **93**, 76); spätere Literatur zitiert bei v. FÜRTH, Vergl. chemische Physiol. d. nied. Tiere, Jena 1903.

2) Bakteriolog. Mitteil. (Zbl. f. Bakt., I, 1897, **22**, 122).

3) Kartoffel als Kulturboden mit einig. Bemerkungen über ein zus. gesetztes Ersatzmittel (ibid. II, 1899, **5**, 102, nach Proceed. Americ. Assoc. Advanc of Sci. 1898, **47**).

4) Mitteil. aus d. Praxis (Zbl. f. Bakt. 1891, **10**, 123); MARPMANNS Rezeptangaben sind ungenügend.

c) Organisierte Nährböden.

Allerlei feste Naturobjekte tierischen oder pflanzlichen Ursprungs und die Produkte mancher Industrien können ohne weiteres als Nährböden verwendet werden; als organisierte Nährböden dürfen wir sie auch im Sinne NÄGELIS bezeichnen, da es sich bei ihnen fast immer um begrenzt quellbare Gebilde oder um Konglomerate von solchen handelt.

Die Zahl der hierher gehörigen Nährsubstrate ist außerordentlich groß; irgendwann und irgendwozu hat man fast alles Erreichbare einmal als Nährboden benutzt. Allen diesen Nährsubstraten gemeinsam ist nur, daß ihre chemische Zusammensetzung äußerst kompliziert, so gut wie unbekannt und überdies außerordentlich wechselnd ist. Die wichtigsten und beliebtesten sind etwa folgende:

Eier. — „Rohe“ Eier, deren Inhalt noch nicht erstarrt ist, geben eine gute Nährlösung, gekochte Eier feste Nährböden ab, auf welchen Pilze im allgemeinen schlecht, Bakterien gut gedeihen. In erster Linie kommen selbstverständlich Hühnereier in Betracht.[1]

ROSENTHAL und SCHULZ[2]) haben folgende Methode zur Herstellung von Alkalialbuminat-Nährböden ausgearbeitet. Das aus Hühnereiern gewonnene Eiweiß wird durch ein Tuch gepreßt und hiernach das Nährsubstrat nach folgendem Rezept:

5	ccm	Eiweiß,
2,4	„	1 % NaOH- oder KOH-Lösung,
2,6	„	Wasser

vorbereitet. In den Reagenzgläsern, Schalen usw. wird die Masse auf 95—98° erhitzt. Zusatz von anorganischen Salzen, wie $NaCl$, KCl, Na_2SO_4, Na_2HPO_4 u. a., machen die Gallerte noch heller, freilich auch weicher; dieselbe Wirkung wird durch Zusatz von Fleischinfus — wegen seines natürlichen Kochsalzgehaltes — erzielt. In dünnen Schichten ist der Nährboden völlig klar. — Er ist bisher nur für Bakterien verwandt worden, gibt aber vielleicht auch bei Kultur anderer Arten von Mikroorganismen brauchbare Resultate.[3]

Mist. — Ist nicht nur in rohem Zustande eine vortreffliche Fundgrube für viele Mikroorganismen, sondern auch nach Sterilisation ein vorzüglicher Nährboden. Für den Laboratoriumsbedarf stellt sich Pferdemist am leichtesten zur Verfügung; auch der im Walde oder in zoologischen Gärten gesammelte Kaninchen- und Wildmist ist für viele Zwecke empfehlenswert. Pferdemist sammle

1) Über Eier anderer Herkunft vgl. TARCHANOFF die Verschiedenheiten des Eiereiweißes bei befiedert geborenen (Nestflüchtern) und bei nackt geborenen (Nesthockern) Vögeln (PFLÜGERS Archiv 1883, **31**, 368). Weitere Mitteil. ibid. 1886, **39**, 476, 485; NEUMEISTER, R., Lehrb. d. physiol. Chemie, Jena 1895, **2**, 121. Ferner DAL POZZO, Das Eiweiß der Kiebitzeier als Nährboden für Mikroorganismen (Medizin. Jahrb. 1887, 523.)

2) Über Alkalialbuminat als Nährboden bei bakteriol. Untersuch. (Biolog. Zbl. 1888, **8**, 307).

3) Vgl. über KARLINSKIS Methode GÜNTHER, Einführ. in d. Bakteriol., 6. Aufl., 213.

man unmittelbar nach der Entleerung ein und lasse ihm seine festgeballte Form. Der Ernährungszustand des mistliefernden Pferdes ist für den Ausfall der Kulturen nicht gleichgültig; jedenfalls gibt Mist von schlecht ernährten Pferden oft kümmerliche Kulturen. Nach BREFELD[1]) soll es für Pilzkulturen notwendig sein, den Mist von Pferden zu nehmen, die fast ausschließlich mit Hafer ernährt werden. Verrotteter, zerfallener Mist gibt nur noch sehr kümmerliche Kulturen. — Analysen von Mist bei HOLDEFLEISS u. a.[2])

Torf. — Torf wird in der Praxis als desinfizierendes Mittel verwandt; autotrophe Organismen verschiedener Art lassen sich auf ihm kultivieren, ohne daß Bakterien störend dazwischen kommen. Läßt man den Torf erst Siedetemperatur durchmachen, so wird seine desinfizierende Kraft abgeschwächt, und es gedeihen auch Pilze u. a. als Verunreinigung der Kultur auf ihm. —Man schneidet durchnäßten Torf vor der Aussaat in handliche Scheiben.

Sehr beliebte organisierte feste Nährböden sind verschiedene Pflanzenorgane. Es läßt sich erwarten, daß die Reserveorgane der Pflanzen — stoffspeichernde Wurzeln, Knollen, die Samen usw. — besonders nährkräftige Kultursubstrate abgeben werden. Ungezählte Kulturen sind bereits auf Kartoffeln, Möhren, gelben Rüben, Zwiebeln, Kohlstrünken, auf Pflaumen, Äpfeln, Birnen, Apfelsinen, Zitronen, Vogelbeeren, auf Nüssen, Senf- und Leinsamen, Getreidekörnern, Malz, geschältem Reis, Kastanien, Galläpfeln, auf Laub, Stengeln von krautartigen Pflanzen (*Vicia* u. dgl.), Holz, Baumrinden, Lohe usw. angelegt worden. Näher auf diese Nährböden einzugehen, erübrigt sich, da sich ihre Behandlung von selbst ergibt. Nur auf die Herstellung der Kartoffelnährböden, die namentlich den Bakteriologen gute Dienste leisten, will ich kurz eingehen.

Kartoffeln. — Man benutzt feste Kartoffeln, die beim Kochen nicht mehlig zerfallen (sogen. Salatkartoffeln), und reinigt sie gründlich. Nach dem Schälen und nach Beseitigung der schadhaften Stellen werden sie in schwacher Sublimatlösung gewaschen und dann in Stücke geschnitten, die in ihrer Form den für Kartoffelkulturen besonders praktischen Reagenzgläsern angepaßt sind.[3]) Kartoffeln reagieren schwach sauer und müssen nötigenfalls ein wenig alkalisiert werden. — Da bei späterem Kochen sich Kondensationswasser bildet, vor dessen Berührung man das Kartoffelstückchen besser bewahrt, so gibt man den über der Gasflamme erweichten Röhren vorher oberhalb des Grundes eine kleine Einziehung oder Verengung, auf welcher die Kartoffel aufliegt, während sich das Wasser unter ihr sammelt, — oder setzt ein kurzes Glasröhrchen in das Reagenzglas hinein und läßt auf ihm die Kartoffel aufliegen.

1) S. u. 118, Anm. 3.

2) Unters. üb. d. Stallmist, 2. Aufl., Breslau 1889; MAYER, A., Die Düngerlehre, 5. Aufl., Heidelberg 1902 u. a.

3) Ausführliches über Herstellung der Kartoffelkeile oder -zylinder z. B. bei GÜNTHER a. a. O., 207.

Von den durch irgendwelche Techniken bereits veränderten Stoffen sind die Mahl- und Bäckerprodukte die wichtigsten.

Brot (Weißbrot). — Ist ein ausgezeichnetes Nährmittel für viele Pilze, Hefen, Bakterien. Man feuchte Brotscheiben mit Wasser oder einer Nährlösung (Milch, Pflaumensaft u. dgl.) an. Die Brotscheiben werden in Gläsern (Bechergläsern u. dgl.) oder unter Glasglocken gehalten. Will man hellfarbige Kolonien auf Brot sichtbar machen, so färbe man es zuvor (Fuchsin u. dgl.). — Auch Brotbrei ist ein beliebtes Kulturmedium (Bakterien, Pilze). — Will man Brot mit einer Nährlösung durchtränken, deren Konzentration unverändert bleiben soll, so trockne man es zunächst einige Stunden bei 100 bis 120° C.

Auch Makkaroni sind als Nährböden empfohlen worden. Für manche Zwecke geeignet sind Cakes, Oblaten u. a. m.

Filtrierpapier ist ebensosehr als wasserunlösliches Substrat für Kulturzwecke brauchbar wie als vorzügliches Nährmittel für zelluloselösende Organismen (Bakterien, Pilze).

Sägespäne geben nach Durchtränkung mit Nährlösung oder bereits ohne solche einen guten Nährboden ab.

III. Kulturen.

Durch Vereinigung der Nährböden mit Mikroorganismen entstehen „Kulturen". Wie sind solche vorzubereiten und anzulegen und für wissenschaftliche Fragen zu verwerten?

Bei der Herstellung einer Kultur ist der Gang der Dinge folgender: Zunächst muß der Nährboden sterilisiert werden. Abgesehen von besonderen Fällen, in welchen uns die Natur einen keimfreien Nährboden liefert, und in welchen es uns gelingt, ihn steril zu gewinnen und steril zu erhalten, sind in allen festen und flüssigen Nährböden allerlei Keime ohne unser Zutun bereits vorhanden; diese müssen abgetötet, die Böden müssen sterilisiert werden, bevor wir zur Aussaat schreiten.

Den sterilen Nährboden bringen wir in irgendwelchen geeigneten Behältern unter, welche die Beobachtung der Organismen gestatten; die Wahl der richtigen Form der Gefäße, in die wir unsere Kultur bringen wollen, gehört zu den wichtigsten Vorbereitungen.

Neue Schwierigkeiten bringt die Aussaat, besonders dann, wenn wir nur „Rohkulturen" vor uns haben, in welchen, wie zumeist in der freien Natur, die verschiedenartigsten Organismen nebeneinander ihr Dasein führen. Wollen wir einen Organismus wissenschaftlich erforschen, so bedarf es einer „Reinkultur", und der Aussaat muß die Isolierung des uns interessierenden Lebewesens vorausgehen.

Ist die Aussaat erfolgt und ist der Nährboden in seiner Zusammensetzung für den betreffenden Organismus geeignet, so wird sich dieser auf dem Substrat vermehren, vorausgesetzt, daß wir ihm günstige Lebens-

bedingungen geben. Die Ansprüche der Mikroorganismen an ihre Umgebung sind nun allerdings sehr ungleichartige: die über der Kultur liegende Atmosphäre wird zu berücksichtigen, die richtige Temperatur zu wählen sein, die Ansprüche an Licht verlangen Berücksichtigung u. dgl. m.

Auf diese und einige andere Fragen wird im folgenden einzugehen sein.

1. Sterilisation.

Trifft man keine besonderen Vorsichtsmaßregeln, so entstehen auch ohne Aussaat auf den Nährböden üppige Vegetationen der verschiedensten Organismen: alle festen und flüssigen Stoffe, mit welchen wir die Nährsubstrate herrichten, die Gefäße, in die wir sie einfüllen, die Luft, die sie berührt — und besonders die staubreiche Laboratoriumsluft —, sind voll von Keimen; Bakterien, Pilze, Hefen, Algen, Protozoën verunreinigen unsere Kultur, wenn nicht Maßregeln zur Beseitigung der ungeladenen Gäste getroffen werden: wir müssen die Nährböden vor der Aussaat sterilisieren.

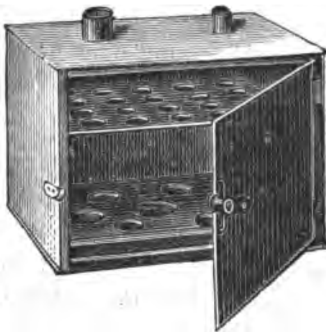


Fig. 2. Heißluftsterilisator.

An Mitteln, welche Mikroorganismen abtöten, ist kein Mangel. Es gibt chemische und physikalische Methoden, aber nicht alle sind gleich wirksam und manche von ihnen von bedenklichen Folgen begleitet, die sie für den Biologen völlig unbrauchbar machen.

Das Universalmittel, das allen Ansprüchen Rechnung trägt, ist Sterilisation durch Hitze. Es sind keine Algen, Hefen, Pilze oder Protozoën bekannt, welche eine Temperatur von 100° C aushielten; wohl aber bleiben die Sporen mancher Bakterienarten selbst bei dieser Temperatur noch lebend. Wollen wir daher bei unserer Sterilisationsarbeit sicher gehen, so werden wir unsere Apparate, Gläser, Lösungen, unsere festen Nährböden usw. auf eine so hohe Temperatur erhitzen müssen, daß auch die mit ihnen eingeschleppten Bakteriensporen den Tod finden. Das wird je nach dem vorliegenden Material auf verschiedene Weise anzustreben sein. Scheren, Messer und Platindraht, Objektträger, Deckgläschen usw. kann man unmittelbar in die Gasflamme einführen und dort sehr hohe Temperaturen durchmachen lassen — Platindrähte kommen schnell bis zur Rotglut —, so daß alle ihnen anhaftenden Keime zugrunde gehen. Gewöhnliche Glasgefäße vertragen eine solche Behandlung nicht, sie müssen in einen Trockenschrank oder Heißluftsterilisator (Fig. 2) gestellt werden, d. h. in einen aus kräftigem Stahl- oder Kupferblech angefertigten, einfach- oder doppelwandigen Kasten, der unten durch eine Gasflamme geheizt wird. Die Temperatur im Innern des Kastens steigt schnell auf 100° und 150°, bei doppelwandigen und mit Asbest ausgekleideten Kästen sogar auf 200° und 300°. Nach ca. einstündiger Einwirkung einer

Temperatur von 150° bis 180° C kann man annehmen, daß alle Mikroben getötet sind; nach Wiederabkühlung sind die Gegenstände „steril" und gebrauchsfertig.

Heiße trockene Luft hat insofern geringe sterilisierende Kraft, als sehr hohe Temperaturen und sehr lange Einwirkungsdauer zur Abtötung der Bakteriensporen erforderlich sind; nach den Untersuchungen von Koch und Wolffhügel[1]) läßt sich z. B. erst nach dreistündiger Einwirkung einer Temperatur von 140° auf völlige Sterilisation rechnen; ganz anders wirkt strömender Dampf (Koch, Gaffky und Loeffler[2])). Gläschen, Reagensröhrchen oder Kolben, welche eine Nährlösung enthalten, werden einfach dadurch sterilisiert, daß man ihren Inhalt unmittelbar über der Gasflamme oder im Wasserbad etwa 10 Minuten sieden läßt. Gefüllte Gefäße, die ihrer Form wegen oder aus anderen Gründen diese Behandlung nicht zulassen, leere Gläser oder gläserne Apparate sterilisiert man im strömenden Dampf, indem man sie in einen sogen. Dampftopf stellt und diesen mit einer Gasflamme kräftig anheizt. Die einfachste Form eines solchen Dampfsterilisationsapparates zeigt Fig. 3. Der mit Filz oder Asbest ausgekleidete Zylinder steht auf einem hohen Fuß, der das Unterschieben der Gasflamme gestattet. Unten bei *W* wird Wasser eingefüllt, das Einsatzgefäß *eg*, dessen durchlöcherte Wände es mit Wasserdampf anfüllen lassen, enthält die mit Nährböden usw. gefüllten Kulturgefäße. Man läßt eine Viertel- oder eine halbe Stunde den Dampf durch den Apparat strömen.[3])

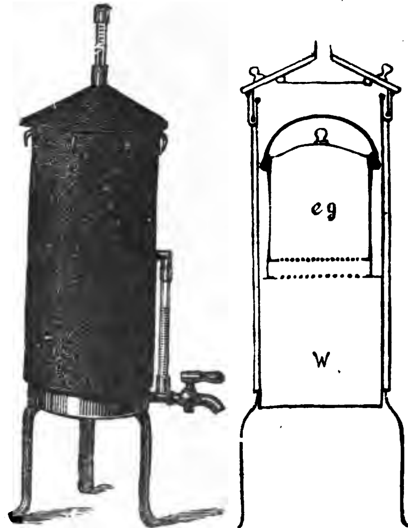


Fig. 3. Dampftopf.

Es gibt Bakteriensporen, welche auch im siedenden Wasser lebend bleiben und der Einwirkung strömenden Dampfes widerstehen können; außerordentlich widerstandsfähige Sporenformen finden sich z. B. auf Mohrrüben, die daher auch bei Erhitzung auf 100° nicht immer steril werden und sich einige Tage nach dem Kochen mit kräftigen Bakterienkolonien bedecken. Um auch

1) Untersuchungen über die Desinfektion mit heißer Luft (Arb. aus d. kaiserl. Gesundheitsamt 1881, **1**, 301).

2) Versuche über die Verwertbarkeit heißer Wasserdämpfe zu Desinfektionszwecken (ibid. 322).

3) Über die verschiedenen Modifikationen des Dampfsterilisators unterrichtet man sich am besten mit Hilfe der illustrierten Kataloge der Werkstätten von P. Altmann-Berlin, E. Müncke-Berlin, Rohrbeck-Berlin u. a.

diese widerstandsfähigen Keime zu beseitigen, muß man wiederholte Sterilisation anwenden: etwa 24 Stunden nach der ersten Behandlung werden die Sporen vieler Arten gekeimt sein, und die vegetativen Zellenformen werden dann bei einer zweiten Erhitzung auf 100° unfehlbar zugrunde gehen. Um auch diejenigen Keime zu treffen, die vielleicht am ersten Tage noch nicht gekeimt waren, wiederholt man die Prozedur ein zweites und drittes Mal. Die Methode der diskontinuierlichen Sterilisation geht auf TYNDALL zurück.



Fig. 4. Autoklav.

Will man diese Umstände vermeiden, so bleibt nichts anderes übrig, als mit hochgespanntem Dampf zu arbeiten. Dazu bedarf es eines Autoklaven (Digestors, Hochdrucksterilisators), dessen hermetisch verschließbarer Kessel einen Druck von mehr als einer Atmosphäre (1½ bis 10 Atm.) aushält (Fig. 4). Da die Autoklaven teuer sind — die kleinsten kosten etwa 150 Mark –, werden sie nicht jedem, der mit Mikroorganismen zu arbeiten hat, zur Verfügung stehen. Ihre Benutzung freilich erspart viel Zeit und Arbeit: Nachdem man in den Kessel des Autoklaven eine mehrere Zentimeter hohe Schicht Wasser geschüttet hat, stellt man mit Hilfe geeigneter Einsatzgefäße (s. o.) oder ähnlicher Vorrichtungen alle zur Sterilisation bestimmten Glassachen, Nährböden usw. ein und heizt mit einer kräftigen Flamme. Der Deckel des Kessels wird aufgelegt, der halbkreisförmige Stahlbügel *B* aufgerichtet und festgeschraubt. Da das starke Sterilisationsvermögen nur dem heißen Wasserdampf, aber nicht der heißen Luft zukommt, läßt man erst diese und noch einige Minuten hindurch Wasserdampf kräftig entweichen und schließt erst dann das Loch bei *N* mit der Schraube *K*. Bei fortgesetzter Heizung steigt der Zeiger des Manometers; dabei entsprechen

111,7°	einem	Druck	von	1,5	Atmosphären.[1])
120,6°	„	„	„	2	„
127,8°	„	„	„	2,5	„
133,9°	„	„	„	3	„
139,2°	„	„	„	3,5	„
144,0°	„	„	„	4	„
148,3°	„	„	„	4,5	„
152,2°	„	„	„	5	„

1) Bei *T* befindet sich eine Vorrichtung zum Einsetzen eines Thermometers. Stimmen die von Thermometer und Manometer abgelesenen Zahlen nicht mit den Tabellen überein, so ist damit angezeigt, daß noch Luft im Kessel enthalten ist.

Das Schiebergewicht *G* ist auf dem Hebel *R* so zu plazieren, daß das Notventil sich nicht öffnet, bevor der gewünschte Druck erreicht ist. Bei 140° C gehen auch die widerstandsfähigsten Keime zugrunde; man unterbricht die Heizung und läßt den Apparat langsam abkühlen, die Schraube *K* wird geöffnet und nach dem Erkalten der Deckel gelöst. — Ein Autoklav tut nicht nur beim Sterilisieren, sondern auch beim Anfertigen von Agarlösung gute Dienste (s. o.). Auf die Grenzen seiner Verwendbarkeit wird sogleich zurückzukommen sein.

Wir haben bisher die Frage vernachlässigt, ob alle Nährböden gleichermaßen eine hohe Erhitzung ertragen. Das ist keineswegs der Fall. So wird Gelatine in ihrem Erstarrungsvermögen durch anhaltendes Erwärmen auf 100° C und noch mehr durch Erhitzen auf noch höhere Temperaturen (s. o. S. 34) sehr geschädigt. Autoklavbehandlung ist daher besser zu vermeiden. Milch muß vor der Verwendung als Kulturmedium gründliche Sterilisationsbehandlung durchmachen; da sie sich aber durch langwährende Erhitzung auf Siedetemperatur in ihrer chemischen Zusammensetzung verändert, ist man auf die fraktionierte Sterilisation angewiesen: Günther (a. a. O., S. 213) rät, sie an drei aufeinander folgenden Tagen je eine Stunde lang im Dampftopf zu halten und in der Zwischenzeit bei 21° C stehen zu lassen.[1]) Beim sogen. Pasteurisieren von Wein, Bier usw. handelt es sich um eine fraktionierte Sterilisation, bei der die Flüssigkeiten mehrmals auf nur 60—70° erhitzt werden. Höhere Temperaturen würden unliebsame Zersetzungen in ihnen hervorrufen. Es wird in diesen und ähnlichen Fällen oft genügen müssen, statt aller in der Flüssigkeit vorhandenen Keime wenigstens diejenigen zu vernichten, welche sich auf dem betreffenden Substrat weiterentwickeln könnten. — Noch mehr muß man dem Blutserum gegenüber mit der Temperatur heruntergehen; dieses liefert schon nach Erhitzung auf 70° kein klares Nährsubstrat mehr, sondern trübt sich. Legt man auf Durchsichtigkeit Wert, so muß man eine Sterilisation durch wiederholte Erhitzung auf ca. 56° C anstreben. Viele Keime sterben dabei ab, widerstandsfähige freilich bleiben am Leben, so daß schließlich oft nur eine Auswahl der Kulturgläschen als keimfrei weitere Verwendung finden kann. Bei Verwendung dieses empfindlichen Mediums empfiehlt es sich, aseptisch zu arbeiten, d. h. von vornherein das von der Natur gelieferte keimfreie Material steril aufzufangen und vor Verunreinigung sorgfältig zu schützen.

Dazu bedarf es steriler Gefäße, von welchen wir schon oben sprachen. Bei ihrer Sterilisation spielt neben der physikalischen Methode auch die chemische Desinfektion ihre Rolle. Man reinigt Gefäße, indem man sie mit warmer Sodalösung (1—2 %) wäscht, dann mit Wasser, schwacher Sublimatlösung (1 oder 2 : 1000), wiederum mit Wasser und schließlich mit Alkohol

---

1) Über die „sterilisierte" Milch des Handels und ihre Mikrobenflora vgl. z. B. Weber (Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamt 1900, **17**, 108).

ausspült. Wer aseptisch arbeiten will, wäscht bei dieser und ähnlichen Gelegenheiten die Hände in Sublimatlösung.

Auf die Lehre von der chemischen Desinfektion kann hier nicht näher eingegangen werden. Nur auf die wichtigsten Mittel sei kurz hingewiesen. — Sublimat nimmt man gewöhnlich in einer Lösung von 1 oder 2 : 1000, hierzu können noch 5 Teile HCl zugesetzt werden („Säuresublimatlösung"). Eiweißhaltigen Flüssigkeiten gegenüber kann Sublimat seine desinfizierende Wirkung insofern verleugnen, als es bei Berührung mit diesen wasserunlösliche Niederschlagshäute bildet. Da sich diese in Weinsäure, Zyankali, Jodkali usw. lösen, begegnet man dem Übelstand durch Zusatz solcher Verbindungen zum Sublimat.[1]) Wie sehr die desinfizierende Wirkung des Sublimats von dem Gehalt der Lösungen an Quecksilberionen abhängig ist, zeigten PAUL und KRÖNIG in einigen sehr lesenswerten Abhandlungen[2]): werden gleichzeitig mit Sublimat andere Chlorverbindungen gelöst und dabei dissoziiert (Chlornatrium u. dgl.), so sinkt demnach die desinfizierende Kraft des Sublimats (wichtig bei Benutzung der beliebten Chlornatrium-Sublimatpastillen). In Sublimatlösungen, welche lange stehen, tritt allmählich eine Zersetzung ein[3]); um den Gehalt einer Lösung an Sublimat zu prüfen, verfährt man mit KOCH[4]) folgendermaßen: man taucht ein Streifchen blank geputztes Kupferblech in die Sublimatlösung; wenn nach einer halben Stunde eine deutliche Amalgamschicht sich bildet, kann man sicher sein, daß mindestens 1 : 5000 Sublimat sich in Lösung befindet.

„Formalin" (40 %ige wässerige Lösung von Formaldehyd) wird mit Wasser versetzt (z. B. 1 Teil F. und 4 Teile H_2O) und erhitzt; die entweichenden Dämpfe desinfizieren kräftig. Sehr verdünnte Formalinlösungen eignen sich zum Abwaschen lebender Naturkörper, die, ohne selbst Schaden zu nehmen, von anhaftenden Bakterien befreit werden sollen.

Wasserstoffsuperoxyd ist neuerdings wiederholt zur Sterilisierung der Milch, Kaliumpermanganat-Salzsäure (1 %ige Lösung + 1 %) als kräftiges Agens von PAUL und KRÖNIG[5]) empfohlen worden. Ob insbesondere Ozon für die Zwecke der Organismenkultur sich als Desinfiziens dienstbar machen ließe, muß noch dahingestellt bleiben. Über „fungizide" Mittel siehe später (Kapitel Pilze).

Die sterilisierende Wirkung anderer physikalischer Agentien (Licht, besonders ultraviolette Strahlen[6]), Elektrizität, Röntgenstrahlen, ferner die photodynamische Wirkung fluoreszierender Lösungen[7]) usw. ist von größtem

---

1) Vgl. z. B. LAPLACE, E., Saure Sublimatlösungen als desinfiz. Mittel (D. Med. Wochenschr. 1887, 866); BEHRING, Über Quecksilbersublimat in eiweißhaltigen Lös. (Zbl. f. Bakt. 1888, **3**, 27, 64; daselbst weitere Literaturangaben).

2) Vgl. unten „Giftwirkungen".

3) Gegen die Wirkung von Licht und Luft macht Zusatz von Säure oder Na Cl widerstandsfähig; vgl. BEHRING a. a. O., VIGNON in C. R. Acad. Sc. Paris 1893, **117**, 793 a. u.

4) Über Desinfektion (Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamt 1881, **1**, 234, 278).

5) KRÖNIG u. PAUL, Die chem. Grundlagen der Lehre von d. Giftwirkung u. Desinfektion (Zeitschr. f. Hyg. 1897, **25**, 1, 77ff.).

6) Vgl. z. B. HENRI, V., HELBRONNER, A., et RECKLINGHAUSEN, M. DE, Nouv. rech. s. la stérilis. de grandes quantités d'eau par les rayons ultraviolets (C. R. Acad. Sc. Paris 1910, **151**, 677); ebendort noch zahlreiche andere Abhandl. über die keimtötende Kraft der ultravioletten Strahlen.

7) s. u. Abschn. 7 (Licht).

theoretischen Interesse und für Hygiene und Therapie bedeutungsvoll, hat aber bisher keine besondere Bedeutung für die Praxis der Mikroorganismenkultur gewonnen.

Will man aus irgendeinem Grunde jegliche Erwärmung vermeiden und überhaupt die in Frage kommenden Keime nicht töten, sondern entfernen, so muß man zur mechanischen Reinigung der Flüssigkeit seine Zuflucht nehmen und die Nährlösung durch ein Filter laufen lassen, das alle Keime zurückhält. Diesen Ansprüchen genügen Filtrierpapiere selbstverständlich nicht, wohl aber „Filtrierkerzen“ aus unglasiertem Porzellan (Chamberland), Ton (Pukall) oder Infusorienerde („Berkefeld“-System) oder Filter aus feinverteiltem Asbest. Die Anwendung der beliebten Filterkerzen veranschaulicht der in Fig. 5 dargestellte Apparat nach MAASSEN[1]): in einen Kolben wird die einer dickwandigen Röhre ähnliche, mit breitem, krempenartigem Rand versehene Kerze luftdicht eingesetzt; das rechts angesetzte Rohr wird mit der Wasserstrahlluftpumpe in Verbindung gebracht, der Heber links dient zur sterilen Entnahme des Filtrats.

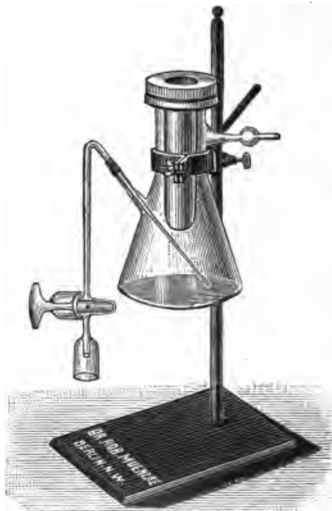


Fig. 5. Kerzenfiltrierapparat.

Bei der Benutzung von Filtern ist zu beachten, daß, günstige Bedingungen vorausgesetzt, manche Bakterien schon binnen 24 Stunden die Filter durchwachsen und diesen damit ihre Bakteriendichtigkeit nehmen können. Die verschiedenen Filtersorten, ja sogar verschiedene Exemplare einer Art verhalten sich hierbei ungleich, so daß sich keine allgemein gültigen Angaben machen lassen; näheres bei E. v. ESMARCH.[2])

Bei Besprechung der in den gebrauchten Nährlösungen sich anhäufenden Stoffwechselprodukte wird noch einmal auf die Verwendung und Behandlung der Filtrierkerzen zurückzukommen sein.

Ist eine Lösung oder ein Nährboden anderer Art auf die eine oder die andere Weise keimfrei gemacht worden, so bleibt seine chemische Zusammensetzung im wesentlichen unverändert. Geringer „autolytischer“ Veränderungen wird man freilich stets gewärtig bleiben müssen.[3])

1) Üb. die Wirkung verschiedener Filter vgl. Referat üb. WOODHEAD u. CARTWRIGHT in BAUMGARTENS Jahresbericht 1895, **11**.

2) Über kleinste Bakterien u. das Durchwachsen von Filtern (Zbl. f. Bakt., I, 1902, **32**, 561); HOFSTÄDTER, E., Üb. d. Eindringen v. Bakt. in feinste Kapillaren (Arch. f. Hyg. 1905, **53**, 205).

3) Über Alkoholbildung in steriler Würze vgl. KLÖCKER, Üb. d. Nachweis kl. Alk.-mengen in gärenden Flüssigk. (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **31**, 108).

2. Form der Kulturen.

Bei der Wahl der Form, die wir unserer Kultur geben wollen, und der Gefäße, in welchen sie untergebracht werden soll, müssen wir zweierlei bedenken: einmal sollen die in der Kultur untergebrachten Organismen der Beobachtung zugänglich sein, und außerdem müssen die Kulturgefäße sich so verschließen lassen, daß der Nährboden vor dem Zutritt fremder Organismen und die Kultur vor Verunreinigung und „Infektion" mit solchen bewahrt bleibt. Um der zweiten Forderung zu genügen, nimmt man Röhren, Flaschen, Kolben oder dgl., die sich mit Watte verschließen lassen, — oder man bedient sich gläserner Dosen, Schalen oder dgl. mit übergreifendem Deckel. In welcher Größe man die jeweils bevorzugte Gefäßform wählt, wird davon abhängen, ob man die Organismen lange Zeit hindurch beobachten und ihnen viel Spielraum zur Entwicklung geben will oder nicht, ob man auf die Gewinnung ansehnlicher Organismenmassen (z. B. zum Zweck chemischer Analyse) legt oder nicht[1]) u. a. m. Alle möglichen Variationen in der Form der Kulturgefäße sind bereits ausprobiert worden; es wird genügen, wenn wir auf diejenigen hinweisen, die wegen ihrer Billigkeit und Handlichkeit allgemeine Anerkennung und Beliebtheit für sich in Anspruch nehmen können.

1. Reagensgläser — z. B. solche von 13 cm Länge und 13 mm Weite — gestatten, auf bescheidenem Raum eine große Anzahl Kulturen unterzubringen. Für Organismen jeder Art, für feste und flüssige Nährböden sind sie tauglich. Man füllt etwa $^1/_5$ bis $^1/_3$ des Röhrchens mit dem Nährsubstrat an, — handelt es sich um gallertartige Nährböden, so kann man diese je nach Bedürfnis entweder bei vertikaler Stellung des Reagensglases oder schräg liegend erstarren lassen; im einen Fall hat die Gallerte nur wenig freie Oberfläche, im andern relativ viel. Ist der Nährboden „schräg" erstarrt, so bildet er unten eine dicke, weiter oben eine dünne Schicht; dieser Unterschied läßt für die Mikroorganismen in den verschiedenen Teilen der Kultur verschiedene Lebensbedingungen zustande kommen, die unter Umständen für die Entwicklung der Kultur bedeutungsvoll werden können.

Sorgfalt erfordert der Watteverschluß, der nicht zu locker aufsitzen und nicht zu fest eingepreßt sein darf. Der Watteverschluß läßt beim Sterilisieren Luft und Wasserdampf durchtreten und beim Abkühlen des erhitzten Gläschens Luft von außen eindringen; die Watte hält dabei als Bakterienfilter alle fremden Keime fern. Die Durchlässigkeit des Watteverschlusses erklärt es ohne

1) Ob besondere Größe der angewandten Kulturgefäße auch für die qualitative Entwicklung der Organismen bedeutungsvoll werden kann, bedarf noch näherer Analyse. Wehmer (Klein. mykol. Mitteil., Zbl. f. Bakt. II, 1897, **3**, 149) führt die reichliche Ausbildung der Sklerotien von *Aspergillus niger* und ihre stattliche Größe, die er manchmal beobachten konnte, auf die Größe der vom Pilz ausgekleideten Oberfläche zurück u. a. m. Es wäre nicht ausgeschlossen, daß das Verhältnis zwischen der Masse der Organismen und der disponiblen Nährlösung indirekt Einfluß auf die Entwicklung der Kultur bekommen könnte.

weiteres, daß bei wochen- und monatelang aufbewahrten Kulturen die Nährlösungen sich vermindern und die Gallerten schrumpfen; gelegentlich finden auch einmal ein fremdes Bakterium oder ein Schimmelpilz den Weg ins Innere. Um beides nach Möglichkeit zu verhindern, bindet man den Wattekopf der Kultur mit Pergamentpapier zu oder setzt die von Weinflaschen her bekannten Bleikapseln auf oder eigens zu diesem Zweck konstruierte Glashütchen.[1]) Auch ist empfohlen worden, durch Eintauchen in Wasserglas die Watte mit einer undurchlässigen Schicht zu versehen.[2])

In Reagensgläsern kann man auch Kartoffel- und Mohrrübenstückchen und andere feste Nährböden unterbringen. Reagensgläser mit einer „Einziehung" (nach Roux), auf welcher das Kartoffelstückchen liegen soll (s. o.), sind in den Werkstätten für hygienisch-bakteriologische Utensilien zu haben; sie sind übrigens auch für den Anfänger leicht herstellbar. Bei Verwendung von Reis und andern Nährböden, die in größerer Masse zur Verwendung kommen sollen, sind Kochkölbchen und Erlenmeyer empfehlenswert.

Handelt es sich darum, Kulturen mit möglichst viel Oberfläche anzulegen, so kann man sich der Esmarchschen Rollkulturen (Rollplatten) bedienen.[3]) Die mit Gelatine und mit Organismen beschickten Reagensgläschen werden unter strömendem Leitungswasser in horizontaler Richtung gedreht, bis die Gallerte erstarrt. Größere Gefäße wie Kolben und weithalsige Erlenmeyer eignen sich für denselben Zweck. Auch Agar läßt sich zu Rollkulturen verarbeiten.[4]) Wenn diese auch schon des geringen Umfanges der Reagensgläser wegen viele Vorteile haben, so bedient man sich doch bei Kultur der Bakterien und größerer Organismen vorzugsweise der im folgenden zusammengestellten Methoden.

2. Eine der Untersuchung leicht zugängliche Oberfläche gewinnt man bei Kultur auf Glasplatten oder in Glasschalen. Koch (a. a. O.) schlug als erster vor, Gelatine auf sterilisierte Objektträger oder noch größere Platten auszugießen, die ohne weiteres mikroskopisch durchmustert werden können. Da aber Sterilisation und Gießen großer Platten immerhin umständliche Manipulationen sind, bedient man sich in den meisten Fällen mit Vorteil der von Petri eingeführten Glasschalen.[5]) Diese bestehen aus einem ca. 1 cm

---

1) Vgl. z. B. Burri, Verwend. eines luft- u. bakteriendichten neuen Verschlusses bei bakt. Arb. (Zbl. f. Bakt., II, 1895, **1**, 627).

2) Bartoschewitsch, S., Die feuerfesten Wattepfropfen f. d. bakt. Probiergläser (Zbl. f. Bakt. 1888, **4**, 212).

3) Über eine Modifik. des Kochschen Plattenverfahrens usw. (Zeitschr. f. Hyg. 1886, **1**, 293).

4) Fränkel, Üb. d. Kultur anaerob. Mikroorganismen (Zbl. f. Bakt. 1888, **3**, 767) nimmt für Rollkulturen 2 % Agar, da bei schwächeren Konzentrationen der Agar sich zu leicht vom Glase loslöst. 2 %iger hat freilich den Übelstand, schon sehr früh wieder zu erstarren.

5) Eine kl. Modifik. des Kochschen Plattenverfahrens (Zbl. f. Bakt. 1887, **1**, 279). Auch: Neue verbess. Gelatineschälchen (ibid. 1900, **28**, 79).

hohen unteren Teil und einem Deckel mit übergreifendem Rand; der Durchmesser beträgt ca. 10 cm. Die Petrischalen kommen in verschiedenen Formen zur Verwendung und neben ihnen eine Reihe anderer Schalen und Glasdosen verschiedener Höhe und Weite, unter welchen nach Bedürfnis zu wählen ist. In Schalen vom üblichen Format gießt man gewöhnlich 30 bis 40 ccm der Nährflüssigkeit oder der verflüssigten Gelatine. Ihres Verschlusses wegen empfehlen sich Glasdosen mit weit übergreifendem, eventuell mit eingeschliffenem Deckel (nach ESMARCH), sowie Dosen, deren aus starkem Spiegelglas gefertigter Deckel mit einer eingeschliffenen Rinne auf die Unterlage paßt. Durch geschicktes Neigen läßt man nach dem Einfüllen von Gelatine oder Agar das verflüssigte Nährsubstrat sich gleichmäßig in der Schale verteilen, so daß der ganze Boden der Gefäße bedeckt wird. Erstarrt der Nährboden in schräger Lage, so kommen wieder die Ungleichmäßigkeiten in den Lebensbedingungen zustande, von welchen soeben die Rede war (s. o.).

Auch bei vorsichtiger Behandlung vermag der Verschluß, den der übergreifende Deckel der Petrischalen gestattet, die Kulturen nicht vor Verunreinigungen zu schützen. Die sog. Soyka-Fläschchen verbinden die Vorteile der Schalen mit den der Reagensgläser: sie gleichen flachen Flaschen, deren Öffnung mit Watte verschlossen wird; nach Einfüllen von Gelatine oder Agar legt man sie horizontal, damit nach dem Erstarren der Gelatine eine plattenähnliche Kulturfläche disponibel wird.

3. Soll eine Kultur dauernd zur mikroskopischen Prüfung bereit sein, so bedient man sich des „hängenden Tropfens". — Wenn ein primitives Verfahren genügt, so trägt man den Tropfen, der die Organismen enthält, unmittelbar auf dem Objektträger auf; für manche Fälle, die freilich nur durch Ausprobieren gefunden werden, ist diese einfache Methode, welche den Organismen reichliche Luftzufuhr garantiert, die beste; zumeist aber wird es nötig sein, die ausgesäten Organismen vor Infektion zu schützen. Das wird erreicht durch die Kultur im hängenden Tropfen. Geeignet für dieses Verfahren sind Objektträger mit eingeschliffener Konkavität: Man legt über diese das Deckgläschen, an dessen Unterseite ein Tröpfchen Nährlösung (oder ein erstarrter Tropfen Gelatine oder dergl.) hängt; — oder man kittet auf den Objektträger eine 0,5—1 cm hohe ringförmige Glasleiste oder einen ähnlichen geeigneten Glasring an, auf welchen das Deckgläschen aufgelegt wird. Deckgläser und Objektträger werden zum Zwecke der Sterilisation durch die Flamme gezogen; GÜNTHER (a. a. O. S. 237) macht darauf aufmerksam, daß eine allzu weitgehende Erhitzung der Deckgläser deren völlige Entfettung herbeiführt; diese ist deswegen zu vermeiden, weil auf völlig entfetteten Gläsern aufgetragene Tröpfchen (infolge der Benetzbarkeit des Glases für Wasser) sich sogleich ausbreiten. — Die Deckgläser werden durch Vaseline mit ihrer Unterlage verbunden. — Genügt z. B. bei Pilz- oder Algenkulturen eine „relative" Sterilisation, so kann man statt der Glasringe durchlochte quadratische Pappscheibchen nehmen, die einige Augenblicke in

kochendes Wasser getaucht und wasserdurchtränkt aufgelegt werden. Alle diese Objektträgerkulturen bringt man auf einem Teller und auf geeigneten Drahtgestellen, die auch ein improvisierter Aufbau ersetzen kann, unter eine Glasglocke, die man nötigenfalls mit feuchtem Filtrierpapier auskleidet. Auf den Teller selbst schüttet man ebenfalls Wasser auf. Glocken aus porösem gebranntem Ton[1]) haben den Vorzug, daß sie den von ihnen umschlossenen Raum nicht nur feucht, sondern auch kühl erhalten.

Komplizierter sind die feuchten Kammern, welche RECKLINGHAUSEN, BREFELD u. a. konstruiert haben, und über deren Verwendung — zumal für mykologische Zwecke — BREFELD[2]) sich ausführlich äußert. Die von ihm konstruierten Kammern bestehen aus einem parallelwandigen (Deckglasdicke), rundlichen, gläsernen Kammerraum; rechts und links befindet sich ein Zu- und Abflußrohr. Durch diese leitet man Nährlösung mit Organismenkeimen in die Kammer und entleert diese wieder. Die an der Glaswand haften gebliebenen Keime mit der adhärierenden Nährlösung stellen die Kultur dar, welche der mikroskopischen Beobachtung dauernd zugänglich ist.

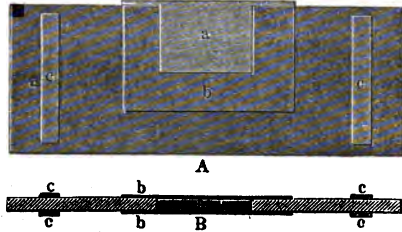


Fig. 6. Mikroaquarium nach SCHAUDINN. A Flächenansicht. B Profilansicht.

Bei der Beurteilung der in Tropfenkulturen beobachteten Erscheinungen sind mancherlei physikalische Wirkungen zu berücksichtigen. — Die Oberflächenspannung der Tropfen übt auf Amöben, Ziliaten, Bakterien und Flagellaten Berührungsreize aus[3]); *Botrytis* bildet „Haftorgane" an dem Oberflächenhäutchen. In erstarrten Gelatinetropfen bilden die vom Innern herauswachsenden Pilzfäden an der konsistenten Oberflächenschicht Appressorien.[4]) Ob gewisse Wachstumsabnormitäten, welche die am Rande flacher Kulturtropfen liegenden Organismen zuweilen auffällig machen, auf die Wirkung des Oberflächenhäutchens zurückzuführen sind, mag dahingestellt bleiben.

4. SCHAUDINNS „Mikroaquarium" dürfte sich zur Kultur von Mikroben eignen, wenn diese einer ständigen mikroskopischen Beobachtung bequem zugänglich bleiben sollen. In einen Objektträger wird (vgl. Fig. 6a) ein viereckiger Ausschnitt eingeschliffen und auf beiden Seiten des Objektträgers mit kochendem Kanadabalsam ein Deckgläschen angekittet (*b*); rechts und

1) ROSAM, A., Poröse Kulturkammern (Zbl. f. Bakt. II, 1908, **20**, 154).

2) Botan. Untersuch. üb. Schimmelpilze, 4. Heft, 1881, 17 ff. — BREFELDsche Kammern liefern die bekannten Firmen wie ALTMANN-Berlin u. a. (à 1,50 M.).

3) MASSART, La sensibilité tactile chez les organismes inférieures. (Journ. soc. méd. et nat. Bruxelles 1890.)

4) BÜSGEN, M., Über einige Eigenschaften der Keimlinge parasitischer Pilze (Bot. Zeitg. I, 1893, **51**, 53, 57). Weitere Angaben auch bei DUGGAR (Bot. Gaz. 1901, **31**).

links werden schmale Glasstreifen als Schutzleisten (*c*) angebracht.[1]) Die Beobachtung der in dem Hohlraum *a* befindlichen Mikroorganismen erfolgt selbstverständlich mit dem Horizontalmikroskop.

3. Isolierung und Reinkultur.

Bakterienhaltige Flüssigkeiten, pilzdurchwucherte Exkremente oder irgendwelche Algenpolster, in welchen sich die uns interessierenden Organismen finden, stellen so gut wie immer ein Sammelsurium der verschiedensten Formen, eine Anhäufung von Organismen aus verschiedenen Klassen des Tier- und Pflanzenreiches dar, und um einen von diesen zu erforschen, müssen wir ihn unbedingt von den andern isolieren. Wir müssen auf irgendeinem Wege zur Reinkultur des betreffenden Lebewesens gelangen. In vielen Fällen wird es genügen, wenn außer dem zur Untersuchung gewählten Organismus kein ihm ähnlicher, der zu Verwechslungen Anlaß geben könnte, in der Kultur sich befindet, und es wird für viele Zwecke nicht schaden, wenn z. B. in Kulturen grüner Algen noch Bakterien sich ansiedeln. Für andere Arbeiten aber, z. B. wenn es sich um ernährungsphysiologische Untersuchungen handelt, werden Mitbewohner jeder Art strengstens auszuschließen sein und „relative Reinkulturen" nicht mehr ausreichen.

Wie gelangen wir zu einer Reinkultur? Wie ermöglichen wir eine Trennung der mikroskopischen Lebewesen voneinander? Zwei Wege stehen uns offen: einmal die mechanische Trennung der Lebewesen und ferner die biologischen Methoden, welche mit den physiologischen Eigentümlichkeiten der Mikroben rechnen, und durch welche es gelingt, in einem Gemisch von Organismen die einen fernzuhalten, andere zuzulassen. Die mechanischen Methoden sind für alle Organismen in gleichem Sinne anwendbar. Das Auffinden biologischer Methoden stellt naturgemäß bei jedem Organismus neue Anforderungen an die Sachkenntnis und den Scharfsinn des Forschers.

a) Mechanische Methoden.

Das Einfangen einzelner Mikroorganismen aus irgendeinem flüssigen Medium, die gewaltsame Trennung von ihren Nachbarn erfordert verschiedene Methoden je nach der Größe und der Empfindlichkeit der Organismen und den Anforderungen, die man an die Reinheit des gewonnenen Materials stellt. Im einfachsten Falle tut es ein schlichter, zur Kapillare ausgezogener Stechheber, eine Pipette mit Gummikappe oder dergl.[2]); bei der Isolie-

1) SCHAUDINN, FR., Ein Mikroaquarium usw. (Ztschr. f. wiss. Mikr. 1894, **11**, 326). — Dort auch Hinweise auf F. E. SCHULZES „Deckglasaquarium" und CORIS „Objekttischaquarium".

2) Vielseitig verwendbar ist BEYERINCKS „Kapillarhebermikroskopiertropfenflasche" (Zbl. f. Bakt. 1891, **9**, 589), die sich von einer gewöhnlichen Spritzflasche dadurch unterscheidet, daß das Ausflußrohr wie bei einem Saugheber einen tief herabführenden äußeren Schenkel hat und das Wasser der Flasche ausfließen lassen würde, wenn nicht seine Spitze kapillar ausgezogen wäre. Erst bei Berührung der Rohrmündung mit einem Objektträger

rung von Protozoën, größerer Flagellaten und Algen u. a., die schon bei schwacher Vergrößerung deutlich sichtbar sind, führt dieses Verfahren zum Ziele. OGATA und WALKER[1]) isolieren schnell schwimmende Mikroorganismen (Flagellaten, Protozoën) in der Weise, daß sie in Kapillaren von mehreren Zentimetern Länge zuerst Wasser (oder eine andere geeignete Flüssigkeit) und dann das mikroorganismenhaltige Medium einströmen ließen. Unter dem Mikroskop verfolgt man das Schicksal der letzteren: sobald eines der Lebewesen hinreichend weit in der Röhre vorgedrungen ist, bricht man hinter ihm die Kapillare ab und überträgt es auf einen geeigneten Nährboden.

Absolute Gewißheit darüber, daß alle in einer Kultur vereinigten Organismen einer Spezies angehören, haben wir bei der formalen Ähnlichkeit vieler Arten nur dann, wenn alle Individuen nachweislich Nachkommen einer Zelle, unsere Kulturen „Einzellkulturen" sind. Beim Arbeiten mit kleinen Pilzsporen oder gar mit Bakterien ist es nicht leicht, die unerläßliche Trennung der Individuen voneinander zu erreichen. BREFELD[2]) war der erste, der diese Forderung erfüllte. Eine kleine Menge sporenhaltiger Flüssigkeit wurde von ihm soweit verdünnt, daß schließlich in einem Tröpfchen davon durchschnittlich immer nur ein Spore vorhanden war. Damit war das Prinzip der Verdünnungsmethode, nach welchem mit geringerer Genauigkeit auch NÄGELI und PASTEUR[3]) arbeiteten, und welches auch späterhin nach mancherlei Modifikationen sich zugänglich erwies, gefunden.

LINDNERS Tröpfchenmethode[4]) besteht darin, daß man Würze oder eine andere Nährlösung mit Hefen oder Pilzsporen verrührt und mit einer Schreibfeder kleine Tropfen der Flüssigkeit auf ein Deckgläschen aufträgt. Die Deckgläser werden, so wie es zur Untersuchung hängender Tropfen (s. o.) notwendig ist, hergerichtet und mikroskopisch gemustert. Diejenigen Tröpfchen, in welchen zufällig nur eine Zelle liegt, werden zum Zweck weiterer regelmäßiger Beobachtung besonders markiert. Befindet sich in allen Tröpfchen mehr als eine Zelle, so muß man das Ausgangsmaterial noch weiter verdünnen und das Auftragen der Tröpfchen noch einmal vornehmen.

Solange man die in einem Tropfen suspendierten Zellen so leicht kontrollieren kann wie bei Hefen und anderen Organismen von beträchtlicher Größe, genügen diese Verfahren sehr wohl. Anders wird es bei Untersuchung

---

oder dgl. fließt ein Tropfen aus, dessen Größe man beliebig regeln kann. Bei Rückwärtsneigung des Apparates arbeitet der Heber im entgegengesetzten Sinne und nimmt von außen zugeführtes Wasser in sich auf.

1) WALKER, E. L., The cultivation of the parasitic Flagellata and Ciliata of the intestinal tract (Journ. med. res. 1908, 18, 487).

2) Botan. Untersuch. üb. Schimmelpilze, 1881, Heft IV, dort Hinweise auf frühere Arbeiten des Verf.

3) Genauere Mitteilungen über die Geschichte der Reinkulturmethoden bei SCHÖNFELD, F., Übersicht üb. d. Meth. zur Reinzüchtung v. Mikroorganismen (Zbl. f. Bakt. II, 1895, 1, 180).

4) Mikrosk. Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, 4. Aufl., Berlin 1905, 201 ff.

der relativ schwer wahrnehmbaren Bakterien. BURRIS Tuscheverfahren (Tuschepunktkultur) beseitigt diese Schwierigkeiten.[1]) Flüssige Perltusche[2]) wird mit Wasser verdünnt (1 : 10) und in Reagensgläsern mit Bakterien beimpft. Nach guter Durchmischung werden von der schwarzen Flüssigkeit kleine Tröpfchen von 0,1—0,2 mm Durchmesser mit einer sterilisierten Zeichenfeder auf einer frisch gegossenen und erstarrten Gelatineschicht aufgetragen und nach dem Eintrocknen mit einem abgeflammtenDeckgläschen bedeckt. Unter dem Mikroskop kontrolliert man dann, wieviel Keime in den schwarzen Tröpfchen liegen: die Bakterienzellen heben sich weiß auf schwarzem Grunde ab, und es ist daher jedesmal leicht zu übersehen, ob eine Isolierung gelungen ist oder nicht. Ist das erstere der Fall, und soll der isolierte Organismus in irgendein Kulturgefäß übertragen werden, so hebt man das Deckglas ab, nachdem aus der isolierten Mutterzelle eine kleine Kolonie geworden ist — die keimhaltigen Tuschescheibchen bleiben an ihm haften — und überträgt einen Teil der neu gewonnenen Kolonie oder die ganze in ein geeignetes Nährsubstrat.

Schon seit mehr als einem Menschenalter in Gebrauch ist KOCHS Verfahren, auf dem Wege der Verdünnung Bakterien zu isolieren[3]): es unterscheidet sich von der soeben angeführten BURRIschen Methode dadurch, daß eine mikroskopische Kontrolle der gelungenen oder nur angestrebten Isolierung bei ihm sich nicht ermöglichen läßt, und man bei Beurteilung der vorgenommenen Manipulationen und ihres Erfolges auf Wahrscheinlichkeitsschlüsse angewiesen ist. In ca. 10 ccm verflüssigter Nährgelatine wird ein Pröbchen von dem bakterienhaltigen Ausgangsmaterial übertragen, indem man entweder ein kleines Quantum Flüssigkeit mit einer feinen Pipette oder eine noch kleinere Menge durch Eintauchen und Abspülen einer Platinnadel in die Gelatine überträgt. Durch Umrühren mit der Platinnadel oder durch Schütteln sucht man die übertragenen Keime möglichst gleichmäßig in der Gelatine zu verteilen; dann gießt man sie in eine sterilisierte Petrischale oder dergl. aus. Auf der Nährgelatine entwickeln sich nun die Keime, und wenn die Isolierung der einzelnen Bakterien voneinander gut gelungen ist, so entstehen auf der Gelatine Kulturen, die sich von einer Zelle ableiten, — vorausgesetzt, daß wir aus der Originalflüssigkeit nicht allzuviel Keime übertragen und diese nicht allzudicht ausgesät haben. Läßt sich annehmen, daß das Ausgangsmaterial sehr keimreich ist, so treibt man die Verdünnung noch weiter, indem man aus dem ersten infizierten Gläschen nach dem Schütteln abermals eine kleine Probe mit dem Platindraht in ein zweites, zunächst noch steriles Gläschen überträgt und dieses — nach gründlicher

1) BURRI, R., Das Tuscheverfahren. Jena 1909.

2) Eine geeignete Tusche ist von GRÜBLER zu beziehen.

3) KOCH, Zur Untersuch. pathogener Organismen (Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt 1881, 1, 1, 18 ff.).

Verteilung des Aussaatmaterials — in die Petrischale gießt, falls man es nicht vorzieht, vorher noch eine dritte und vierte Verdünnung anzufertigen.

Dieselben Methoden, welche eine Reinkultur vorbereiten helfen, ermöglichen es auch, die in einem bestimmten Quantum Wasser enthaltenen Keime zu zählen. Hierauf vor allem beruht die bakteriologische Wasseranalyse. Über sie und über die Methoden der „biologischen" Luftanalyse gibt eine umfangreiche Spezialliteratur Auskunft, auf die hier nur kurz hingewiesen werden kann.[1]) —

Kochs Methode, die unbedingt zu den technischen Grundlagen der wissenschaftlichen Bakteriologie gezählt werden muß, hat verschiedene Schattenseiten: es fehlt die mikroskopische Kontrolle darüber, ob wirklich die Kolonien sich nur von einer Zelle herleiten. Ferner ist sie an das Material der Gelatine gebunden, die keineswegs allen Mikroorganismen zusagt. Ferner gestattet die Kochsche Methode ebensowenig wie die Burrische, eine bestimmte Mikrobenzelle, die unter dem Mikroskop ausgesucht werden kann, als Aussaatmaterial und Stammzelle einer Kultur zu verwenden. Hier hilft uns eine Methode, welche Schouten[2]) beschrieben hat, und welche bei Behandlung vieler Fragen der Mikrobenphysiologie und der Abstammungslehre die anderen Isolierverfahren sehr vorteilhaft zu ergänzen berufen sein dürfte: Schouten unternimmt es, mit feinen Instrumenten unter dem Mikroskop Bakterienzellen aus der Originalflüssigkeit in ähnlicher Weise herauszufischen, wie es vorhin (S. 55) für die größeren Formen unter den Mikroorganismen angegeben wurde. Die Operation wird von A bis Z unter dem Mikroskop ausgeführt mit feinsten Glasnadeln, deren Bewegungen zu regeln folgende Vorrichtung gestattet. In Fig. 7 sind von dem Mikroskop der Fuß *JJ* gezeichnet, der auf dem Bügel *B* der Metallplatte *A* aufruht, der Spiegel *I*, die Irisblende *H*, der Beleuchtungsapparat *G*, der Objekttisch *F* und das Objektiv *K*. Auf dem Objekttisch befindet sich eine feuchte Kam-

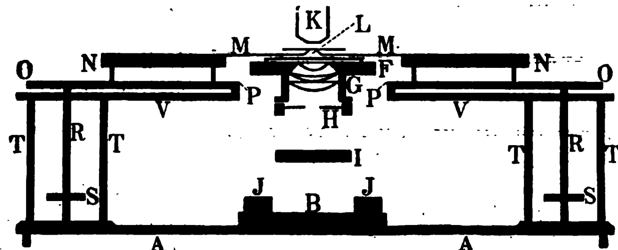


Fig. 7. Schoutens Isolierapparat.

1) Vgl. z. B. Mez, C., Mikrosk. Wasseranalyse, Berlin 1898; Wichmann, H., Die technisch mykol. Analyse des Wassers (Lafars Handb. d. techn. Mykol., Jena 1905, **3**, 334); Kohn, E., Zur Biol. d. Wasserbakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **15**, 690); Hesse, W., Üb. quantit. Bestimmung der in der Luft enthalt. Mikroorganismen (Mitteil. a. d. Kais. Gesundheitsamt 1884, **2**, 182); Petri, Zusammenfass. Bericht üb. Nachw. u. Best. d. pflanzl. Mikroorganismen in d. Luft. (Zbl. f. Bakt. 1887, **2**, 113, 151).

2) Schouten, S. L., Reinkulturen aus einer unter dem Mikroskop isolierten Zelle (Zeitschr. f. wiss. Mikr. 1905, **22**, 10), Meth. z. Anfertigung d. gläsernen Isoliernadeln usw. (ibid. 1907, **24**, 258).

mer, die als „Isolierkammer" (L) eine besondere Konstruktion hat. Ihre linke und rechte Seitenwand nämlich sind mit einem horizontalen Spalt versehen, der mit dickem Öl verschlossen werden kann. Durch diese sind zwei Glasnadeln M, deren Form Fig. 8 veranschaulicht, gestochen. „Zwei Glasstücke, die sich oben an den Spalten befinden, können weggenommen werden, wenn man die Nadeln herausnehmen oder wieder an ihren Platz bringen will. Wenn man sie zu diesem Zwecke jedesmal wieder durch den Spalt stecken müßte, so würde man Gefahr laufen, die feinen Spitzen, auf die alles ankommt, abzubrechen." Die feuchte Kammer kann vermittelst des beweglichen Objekttisches verschoben werden; man legt auf sie das Deckglas, an dessen Unterseite die Isolierung vorgenommen werden soll. „Die Nadeln sind jede an einem Halter N befestigt, der sich auf einem Kupferstab O befindet, der um einen Punkt P drehbar ist. Am Ende des Stabes befindet sich ein rundes Stahlplättchen, vermittelst dessen er auf einem vertikalen Stab R ruht. R kann vermittelst des Triebes S auf und nieder geschraubt werden. — Es versteht sich von selbst, daß die Spitze von M in die feuchte Kammer nach unten geht, wenn R nach oben geschraubt wird, und umgekehrt. Die Schraube an R hat eine ziemlich feine Ganghöhe, und der Hebelarm O ist ungefähr doppelt so lang als der Abstand P bis zur Spitze der Glasnadel. Man kann somit sehr geringe Veränderungen zustande bringen. Der Drehpunkt P wird durch eine Kupferstange V getragen, welche an den Säulen T befestigt ist. — Die Halter N kann man mit den Glasnadeln bequem von dem Instrumente nehmen, wenn die Glasstückchen, welche die Seitenspalten bedecken, weggenommen sind."

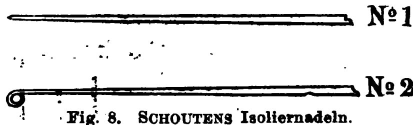


Fig. 8. SCHOUTENS Isoliernadeln.

Die in Fig. 8 dargestellten Glasnadeln — Nr. 2 mit einem „Auge" (Durchmesser 9 μ, Drahtdicke 25 μ) — sind zur Isolierung kleinster Organismen geeignet. Verfasser verfährt wie folgt: Man setzt das Mikroskop auf den Isolierapparat, bringt in die Nadelhalter N Glaserkitt und legt darauf die Nadeln so, daß die umgebogenen Enden nach oben weisen, sich beinahe mitten unter dem Objektiv berühren und sich etwas tiefer als der obere Rand der Isolierkammer befinden. „Dann legt man die losen Stücke wieder auf die Seitenspalten und ein Deckglas auf die Isolierkammer. Nun drückt man die Nadeln so tief in den Glaserkitt, daß die Enden bei einem ungefähr horizontalen Stand durch Bewegung der Triebe S die Unterseite des Deckglases berühren können, aber auch mindestens 2 mm nach unten bewegt werden können." Auf das Deckgläschen, auf welchem die Isolierung vor sich gehen soll, setzt man nun einige kleine Tröpfchen der bakterienhaltigen Flüssigkeit, die nötigenfalls vorher so weit verdünnt werden muß, daß man die Lebewesen einzeln deutlich wahrnehmen kann, — und daneben trägt man eine Reihe steriler Nährlösungstropfen auf („Materialtropfen" und „Kultur-

tropfen", vgl. *a* in Fig. 9). Einem der Materialtropfen nähert man sich mit der einen der beiden Glasnadeln (*b* und *c*, bei zunehmend stärkerer Vergrößerung betrachtet) und versucht ein winziges Tröpfchen aus ihm herauszuziehen (*d*); es gelingt schließlich Tröpfchen zu erhalten, welche nur einen Organismus enthalten (*e*). Damit sich aber die Tröpfchen gut trennen und selbständig abrunden, muß man das Deckgläschen, bevor man es zur Sterilisation durch die Flamme zieht, mit ein wenig Vaseline einreiben. Die andere Nadel taucht man in einen sterilen Kulturtropfen, entleert ihr „Auge", indem man es vorsichtig auf dem Deckglas auftupft und zur Abgabe eines Tröpfchens zwingt (*f*). Berührt man dann mit der keimfreien Nadel das organismenhaltige Tröpfchen, so nimmt sie Flüssigkeit und gleichzeitig die in ihm enthaltene Zelle auf. Man setzt diese neben einem der keimfreien Kulturtropfen nieder (*g*) und bringt es schließlich in diesen (*h*).

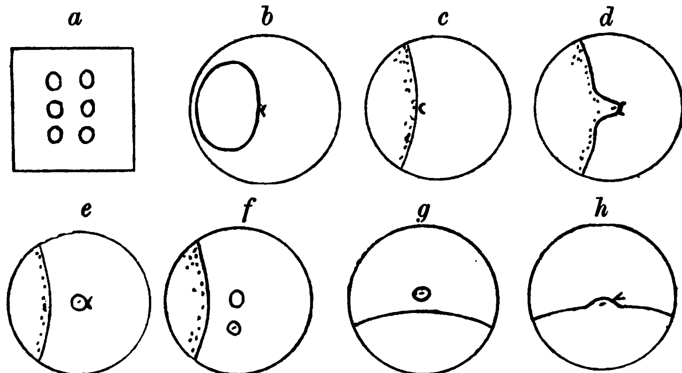


Fig. 9. Isolierung nach SCHOUTEN.

Auf alle Einzelheiten der Methode einzugehen, ist hier nicht möglich. Ich verweise auf die Originalabhandlungen.[1])

b) Biologische Methoden.

Diese sind den Lebenseigentümlichkeiten der Organismen anzupassen und daher von Fall zu Fall zu modifizieren. Es versteht sich von selbst, daß die nachfolgende Behandlung der biologischen Isolierungsmethoden noch mehr als andere Kapitel des Buches auf die Wiedergabe einiger Beispiele sich beschränken muß.

Die Widerstandsfähigkeit gegen hohe Temperaturen, die manche Organismen auszeichnet, gestattet, sie von anderen zu trennen: die widerstandsfähigen überleben die empfindlicheren Arten, die je nach ihrer Natur bereits bei 30° Wärme (z. B. manche Protozoën) oder erst bei Siedetemperatur (viele Bakterien) zugrunde gehen, — oder es gelingt, bei Kultur im Wärmeschrank die Entwicklung mancher Organismen hintanzuhalten und die der andern zu fördern. Das bekannteste Beispiel ist das alte Verfahren,

1) Eine ähnliche Methode wie SCHOUTEN hat BARBER zur Isolierung von Mikroben empfohlen (On heredity in certain microorganisms, Kansas Univ. Sci. Bull. 1907, 4,3).

vom Heubazillus (*Bacillus subtilis*), der sich an Heu allenthalben findet, Reinkulturen zu gewinnen. Man neutralisiert kalt gewonnenen Heuinfus und läßt die Flüssigkeit ca. eine Stunde kochen. Läßt man hiernach die Heubouillon (z. B. bei 36° C) stehen, so entwickelt sich eine kräftige Bakterienvegetation, die fast immer eine Reinkultur des Heubazillus darstellt; alle anderen Organismen, die in dem Heuinfus vorhanden gewesen waren, sind durch das Kochen zugrunde gegangen.[1])

Andere biologische Methoden knüpfen an das Bewegungsvermögen der Organismen an. Es gibt Diatomeen, die auf Agarplatten durch schnelles Kriechen sich von der Aussaatstelle bald weit entfernen; zuerst schleppen sie noch fremde Organismen als Verunreinigung mit, diese bleiben später zurück, so daß man die Diatomeen rein gewinnen kann. Bei manchen schnellwachsenden Pilzen erlaubt die Wachstumsbewegung der Hyphenspitzen, diese rein zu gewinnen. Auch unter den Protozoën gibt es schnellwandernde Formen. Eine hübsche Methode ist die von CARNOT und GARNIER[2]) vorgeschlagene, bewegliche Bakterien durch feuchten Sand vorwärts wandern zu lassen. In kommunizierende Röhren wird 10—20 cm hoch Sand und Nährflüssigkeit eingefüllt: die eine Seite wird beimpft, an der anderen werden die Ankömmlinge abgehoben; die schnellsten Formen langen natürlich zuerst an. — Lichtempfindliche Organismen, die etwa gleich den Schwärmern der Algen an der hellsten Stelle des Präparates sich sammeln, erleichtern schon dadurch die Arbeit des Isolierens. Ebenso steht es mit chemotaktisch empfindlichen Lebewesen, die aus einer Mischkultur in die mit anlockenden Stoffen gefüllte Kapillare[3]) hineinwandern und sich von selbst isolieren. Wie vorteilhaft sich die Chemotaxis bei Isolierung von Bakterien bewähren kann, zeigte z. B. ALI-COHEN.[4])

Außerordentlich zahlreich und variantenreich sind die Versuche, ernährungsphysiologische Eigentümlichkeiten der Organismen zu ihrer Isolierung zu benutzen. Man kann durch Anwendung saurer Nährböden alkaliliebende Formen fernhalten, durch alkalische Nährböden die Säurefreunde; man kann die Konzentration der Nährlösung soweit erhöhen oder (bei marinen Organismen) erniedrigen, daß viele Arten aussterben; man hat durch Kampferzusatz Pilze von Bakterienkulturen, Algen durch Zusatz von Kupfer fernzuhalten gesucht. Überall ist das Prinzip das, für den gesuchten Organismus die Bedingungen möglichst günstig, für die andern möglichst ungünstig zu gestalten. Es ergibt sich von selbst, daß die Trennung auf diesem

1) Näheres über die Methode bei ZOPF, Spaltpilze, 3. Aufl., 1885, 74.

2) De l'emploi des tubes de sable comme méthode générale de l'étude d'isolement et de sélection des microorganismes mobiles (C. R. Soc. Biol. 1902, 860).

3) PFEFFER, Über chemotakt. Beweg. v. Bakterien, Flagellaten u. Volvozineen (Untersuch. botan. Inst. Tübingen 1886—1888, **1**, 582).

4) Die Chemotaxis als Hilfsmittel der bakteriolog. Forschung (Zbl. f. Bakt. 1890, **8**, 161); ferner KNIEP, Untersuch. üb. d. Chemotaxis der Bakterien (Jahrb. f. wiss. Bot. 1906, **43**, 215).

Wege unmöglich sein wird, wenn mehrere Arten die gleichen oder annähernd gleiche Ernährungsansprüche machen; dann wird auch fortgesetztes Überimpfen immer nur dieselben Mischkulturen liefern. Handelt es sich aber um Lebewesen mit ausgesprochener ernährungsphysiologischer Eigenart, dann besteht Aussicht, durch „elektive" Kultur sie rein erhalten zu können. So z. B. wird man die Nitritbildner, die neben vielen anderen Bakterien im Boden leben, von den andern trennen können, wenn man eine Bodenprobe in eine nur den Nitritbildnern zuträgliche Nährlösung bringt und aus dieser nach einiger Zeit in eine ebensolche Lösung überimpft; die Beimengungen treten mehr und mehr zurück, die gesuchten Nitritbildner liegen schließlich in Reinkultur vor. Solche Isolierungsverfahren sind von großem Wert besonders dann, wenn aus irgendeinem Grunde z. B. KOCHs bequeme Methode nicht anwendbar ist. Caeteris paribus bleiben aber im allgemeinen die mechanischen Methoden den biologischen vorzuziehen, da, von Ausnahmefällen abgesehen, doch nur durch sie endgültige Gewißheit über die Reinheit einer Kultur sich gewinnen läßt.

Die von WINOGRADSKY[1]) für die Isolierung der Nitritbakterien ersonnene Methode der „negativen Platten" hat zwar für diese keine befriedigenden Resultate gezeitigt; ich möchte aber die Methode hier trotzdem erwähnen, weil sie vielleicht zu erfolgreichen Verfahren für andere Organismen anregen könnte. Impft man auf eine gewöhnliche (organische Substanz enthaltende) Nährgelatine aus einer Nitritbakterien enthaltenden Kultur über, so entwickeln sich nur die verunreinigenden Beimengungen, da die Nitritbakterien auf einem organischen Substrat sich nicht entwickeln können. Entnimmt man nun weiteres Impfmaterial den freigebliebenen Stellen der Gelatineoberfläche, so besteht Aussicht, daß man die gesuchten Nitritbakterien erwischt. Die Methode ist freilich unsicher und schwierig.

4. Impfen.

Das Impfen, d. h. das Übertragen von Organismen auf einen Nährboden, erfordert Vorsicht und geschickte Hände. Unser Bemühen muß darauf gerichtet sein, bei der Impfung alle fremden Organismen fernzuhalten. Wir bedienen uns zum Übertragen vorzugsweise eines Platindrahtes[2]), der vor der Benutzung in der Gasflamme ausgeglüht und dadurch steril gemacht wird. Handelt es sich darum, größere Mengen der Mikroorganismen oder des sie umgebenden Materials zu übertragen, so wird man sich zweckmäßig eines Schabers[3]) oder eines spatel- oder lanzettförmigen Apparats („Drigalskispatel" u. ähnl.) bedienen.

---

1) Rech. s. l. organismes de la nitrification (Ann. Inst. Pasteur. 1890, **4**, Nr. 4); OMELIANSKI, V., Üb. die Isolierung der Nitrifikationsmikr. aus dem Erdboden (Zbl. f. Bakt. II, 1899, **5**, 537).

2) Stücke von Platindraht werden entweder in einen Glasstab eingeschmolzen oder an einem hölzernen oder metallenen Heft mit Schraubenkappe befestigt. Beim Abimpfen von Flüssigkeiten empfiehlt es sich, das Ende der Nadel zur Öse zusammenzuschließen.

3) Vgl. z. B. SCHREIBER, Ein neuer Bakterienschaber (Zbl. f. Bakt. I, 1912, **63**, 543). Über den „Platinpinsel" PFAFFENHOLZ, Hyg. Rundsch. 1895, 733. Über die Kappennadeln berichtet A. MEYER, Prakt. d. bot. Bakterienkde. 1903, 49, 50.

An Stelle der Platinnadel kann man nach WINOGRADSKYS Vorgang auch eine sehr feine, frisch ausgezogene Glaskapillare benutzen. Eine besondere Sterilisation ist nicht nötig, da die über der Gasflamme ausgezogene Röhre schon auf hinreichend hohe Temperaturen erhitzt worden ist. Unter dem Mikroskop führt man die Kapillare auf die betreffende Kolonie und dann auf den neuen Nährboden, an dem sie schließlich abgebrochen wird.

Auch gut ausgekochte sterile Pinsel sind (Bakterien, Hefen) bereits zur Aussaat benutzt worden.

Die Kultur, der das Material entnommen werden soll, wird erst geöffnet, wenn uns die sterilisierte Impfnadel zur Hand ist.

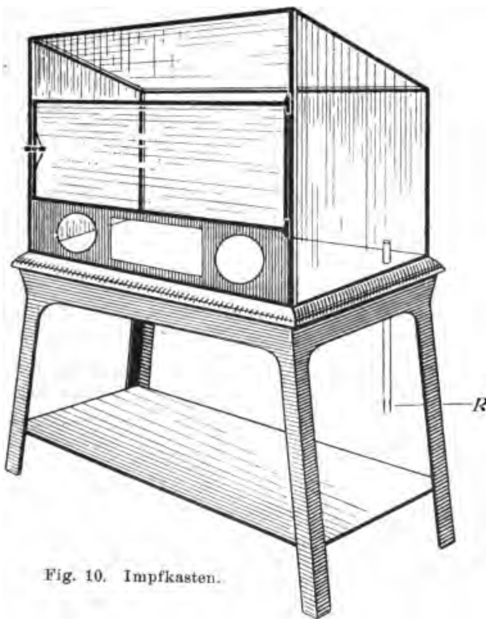


Fig. 10. Impfkasten.

Handelt es sich um eine Petrischale oder dergl., so muß der Deckel ein klein wenig gehoben werden; den Deckel auch seitlich zu verschieben, ist ganz unnötig und nur schädlich. Handelt es sich um eine mit Watte verschlossene Kultur, so sengen wir zunächst die Oberfläche des Wattestöpsels ab, sengen nach Abheben des Watteverschlusses ferner den Rand des Reagensglases oder dergl. ab und holen mit dem Platindraht eine kleine Portion von den Mikroorganismen oder ihren Sporen heraus. Das Kulturröhrchen hält man — vorausgesetzt, daß es einen festen, unverflüssigten Nährboden enthält — während der Prozedur verkehrt, um das Hineinfallen fremder Keime zu verhindern. Nach der Entnahme schließt man das Röhrchen wieder und überträgt mit dem Platindraht die Probe auf einen andern, zunächst noch sterilen Nährboden, nachdem man auch hier Wattestöpsel und Glasrand abgesengt hat. Der Geübte arbeitet so schnell, daß eine Infektion nur ausnahmsweise eintritt. Da aber oft die Entnahme von Material nicht mit der gewünschten Eile zu erledigen ist, erleichtert man sich das Geschäft sehr durch Anwendung eines sterilisierbaren Impfkastens. Fig. 10 stellt einen erprobten Apparat dar, der meines Wissens zuerst im Leipziger Botanischen Institut Verwendung gefunden hat. Die Einrichtung erklärt sich von selbst. Bei *R* wird die Verbindung mit einem kleinen Wasserkessel hergestellt; dieser wird mit einer Gasflamme angeheizt, bis das Glashäuschen mit Wasserdampf erfüllt ist; dieser schlägt alle in der Luft des

Häuschens suspendierten Keime nieder. Die vordere Wand des Kastens ist als Tür eingerichtet; in ihrem unteren Teil genügen zwei runde, durch Klappen verschließbare Öffnungen für die Hände des Arbeitenden zur Einführung von Platinnadeln und Kulturen, falls man nicht vorgezogen hat. diese schon vor der Dampfdurchleitung in den Impfkasten zu stellen. Vor dem Impfen tut man gut, Hände und Unterarme mit Sublimat oder dergl. zu waschen.

Steht kein Impfkasten zur Verfügung, so impfe man nötigenfalls über einem mit kochenden Wasser gefüllten Topf, der aufsteigende Wasserdampf verhindert es, daß fremde Keime in die geöffneten Kulturbehälter fallen.

Ob viel oder wenig Aussaatmaterial für die neue Kultur Verwendung findet, mag in vielen Fällen gleichgültig sein. Wir kennen aber Fälle genug, in welchen die Quantität der Aussaat für das Bild der neuen Kultur entscheidend ist[1]); namentlich aber wird bei Aussaaten, die zum Zweck quantitativer chemischer Untersuchungen angestellt werden, darauf zu sehen sein, daß immer gleiche oder doch kontrollierbare Quantitäten ausgesät werden. Geht man bei der Impfung von bakterienhaltigen Flüssigkeiten aus, so wird man sich in der Weise helfen können, daß man die zur Impfung benutzte Platinnadel jedesmal gleich tief in die Flüssigkeit eintaucht, so daß jedesmal ungefähr gleich viel Bakterien an ihr haften bleiben. Bei Pilzen verfährt man zweckmäßig in der Weise, daß aus gleichalten Zonen einer Mycelplatte gleich große Stückchen herausgeschnitten werden und diese — Agar plus Pilz — auf das neue Nährmedium übertragen werden. Mit diesen beiden Verfahren wird man auch anderen Organismen gegenüber in vielen Fällen auskommen.

Einen Apparat, der bei Anfertigung von Bakterienkulturen genaue Dosierung des Aussaatmaterials gestattet, haben Spitta und Müller[2]) konstruiert. Wie Fig. 11 veranschaulicht, wird komprimierte Luft durch eine poröse Tonplatte geleitet; über dieser befindet sich die mikrobenhaltige Flüssigkeit. Das Gas durchzieht diese in feinster Bläschenverteilung — man beginne bei einem Druck von $1\frac{1}{2}$ Atmosphären und ermäßige ihn nach einigen Minuten auf $1\frac{1}{4}$ — 1 Atmosphäre; die Bläschen reißen aus der Aufschwemmung ein feines Spray nach oben, das bei 1 Atmosphäre 10—12 cm hoch steigt und die darüber lagernde Petrischale gleichmäßig besprüht. Sind der Druck, der Abstand der Kulturfläche vom Spiegel der Flüssigkeit *b* und die Höhe der letzteren ungefähr konstant, so wird in gleicher Zeit immer annähernd die gleiche Menge Flüssigkeit versprüht wer-

1) Vgl. z. B. Stevens, F. L., a. Hall, J. G., Variation of fungi due to environment (Bot. Gaz. 1909, **48**, 1).

2) Spitta u. Müller, A., Beitr. z. Frage des Wachstums u. d. quantitativen Bestimmung v. Bakt. an d. Oberfl. von Nährböden (Arb. Kais. Gesundheitsamt 1909, **33**, 145).

den, wenigstens wenn die Verstäubung eine Zeitlang bereits im Gange ist. Nach SPITTA und MÜLLER werden bei 1 Atmosphäre in der Minute 20—50 mg Wasser versprüht und die in ihnen suspendierten Keime ausgesät.

Handelt es sich um Kulturen mit viel Oberfläche — Petrischalen, Reagensgläser mit schräg erstarrter Oberfläche —, so fertigt man „Strichkulturen" an, indem man die Platinnadel und das ihr anhaftende Organismenmaterial auf der Gallerte abstreicht; sollen Reagensgläser mit gerade erstarrtem Nährboden infiziert werden, so sticht man mit der Nadel in diesen ein und gewinnt eine „Stichkultur". Sollen die Mikroben im Innern der Gallerte wachsen, so beimpft man den Nährboden vor dem Erstarren und schüttelt die flüssige Masse gut durch. — Bei Kulturen mit Nährlösungen kann es sich natürlich nur darum handeln, die Impfnadel abzuspülen und die auf ihr übertragene Materialprobe in der Nährlösung gut zu verteilen.

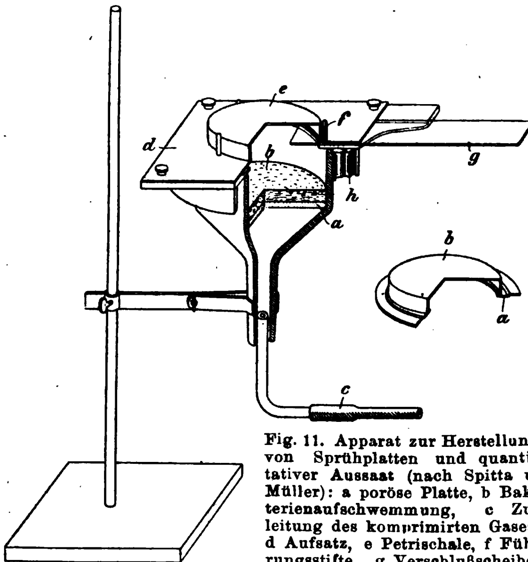


Fig. 11. Apparat zur Herstellung von Sprühplatten und quantitativer Aussaat (nach Spitta u Müller): a poröse Platte, b Bakterienaufschwemmung, c Zuleitung des komprimirten Gases, d Aufsatz, e Petrischale, f Führungsstifte, g Verschlußscheibe, h Kleinfächer.

Einige Schwierigkeiten macht das Überimpfen dann, wenn die Kolonien, von welchen man auszugehen hat, sehr klein sind (Algen, Bakterien); ohne Hilfe des Mikroskops kommt man oft nicht aus. Es sind verschiedene Vorrichtungen beschrieben worden, welche eine sichere Führung der Platinnadel ermöglichen[1]) und besonders die Gewißheit geben sollen, daß man die richtige Kolonie getroffen hat. Liegt z. B. eine nach KOCHS Methode gegossene Platte mit zahlreichen, verschiedenartigen Kolonien vor, so kann man sich der UNNAschen Bakterienharpune bedienen: diese wird — ähnlich wie ein Objektmarkierer — an Stelle des Objektivs an den Tubus des Mikroskops angeschraubt.[2]) Senkt man diesen, so trifft man mit der Harpune die Kolonie, die man vorher in die Mitte des mikroskopischen Gesichtsfeldes eingestellt hatte.

5. Atmosphäre.

Die chemischen Faktoren, welche Leben und Wachstum eines künstlich kultivierten Organismus beeinflussen können, liegen nicht nur in dem Nähr-

1) PRAUSNITZ, Kleinere Mitteil. z. bakt. Technik (Zbl. f. Bakt. 1891, **9**, 128).
2) UNNA, Die Bakterienharpune (Zbl. f. Bakt. 1892, **11**, 278).

boden, mit dem wir uns bisher beschäftigt haben, sondern auch in der Atmosphäre, die über diesem liegt; wir erwähnten bereits, daß der Sauerstoff der Luft als O-Quelle eine unvergleichlich wichtige Rolle spielt, daß einige Gruppen von Lebewesen den elementaren Stickstoff der Luft verarbeiten können, und einige weitere Gruppen insofern als prototroph bezeichnet werden können, als sie den CO_2-Gehalt der Luft zum Aufbau komplizierter organischer Verbindungen benutzen. Während nun auf diejenigen Organismen, welche N und CO_2 der Luft nicht verwerten können, die Gegenwart dieser Gase im natürlichen Gemisch unserer Atmosphäre, soweit bisher bekannt, keinerlei schädlichen Einfluß hat, sind zahlreiche Organismen bekannt, welche den Sauerstoff meiden, d. h. ohne ihn besser gedeihen als in seiner Gegenwart oder diesen überhaupt nicht ertragen, und ferner andere, welche mit und ohne atmosphärischen Sauerstoff gedeihen können, und zum Teil dabei verschiedene Wachstums- und Gestaltungsprozesse sichtbar werden lassen. Es wird hiernach zu untersuchen sein, wie man über Nährböden und Organismen eine Atmosphäre von beliebig gewählter Zusammensetzung schaffen kann, und ob unbeabsichtigte Verunreinigungen der Luft auf die Kultur von Einfluß sind.

a) Kultur ohne Sauerstoff.

Die alte Auffassung, daß freier Sauerstoff für die Entwicklung aller Lebewesen unerläßlich sei, ist schon längst dahin berichtigt, daß bei vielen nicht die Sauerstoffatmung und Oxydation, sondern ein anderer chemischer Prozeß, die Gärung, für die lebendige Substanz die nötige Energie liefert. Für sehr viele Organismen kommt nur die erste Art der Energiegewinnung in Betracht, für andere nur die Gärung; bei einer dritten Gruppe ist den Lebewesen beides möglich: sie verwerten gegebenenfalls den ihnen zugänglichen Sauerstoff und helfen sich bei Abwesenheit des letzteren mit Energiegewinn durch Gärung.

Lebewesen, welche keines Sauerstoffs bedürfen und zu „anaërober“ Entwicklung befähigt sind, gibt es in verschiedenen Klassen des Protistenreiches, — Lebewesen, auf welche Gegenwart von Sauerstoff entwicklungshemmend wirkt, fast nur unter den Bakterien. Für letztere besonders werden Vorrichtungen und Methoden anzuführen sein, durch welche es gelingt, den Sauerstoff fernzuhalten. Solcher Methoden gibt es eine große Zahl; sie alle hier zu beschreiben, ist überflüssig; es wird genügen, auf eine Auswahl hinzuweisen und auf die leitenden Prinzipien der Verfahren aufmerksam zu machen.[1]) —

1) Vgl. die einschlägigen Kapitel in HÜPPE, Die Methoden der Bakterienforschung, 5. Aufl., Wiesbaden 1891; GÜNTHER, Einführung in das Studium der Bakteriologie, 6. Aufl., Leipzig 1906 u. a.; ferner FERMI und BASSU, Untersuch. über Anaërobiosis (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1904, **35**, 563); OMELIANSKI, W., Züchtung anaërob. Kleinwesen (LAFARS Handb. d. techn. Mykol., 1907, **1**, 576), sowie die bekannten bakteriologischen Jahresberichte.

Das radikalste Vorgehen wäre wohl das, die Organismen in einem luftleeren Raum zu kultivieren. Man hat in der Tat versucht, Reagensgläser und andere Kulturgefäße mit der Luftpumpe zu evakuieren, — ich verweise auf die Versuche von GRUBER.[1]) ZUPNIK[2]) kultivierte die Anaëroben im TORICELLIschen Vakuum und gewinnt dadurch die Möglichkeit, die von den Organismen gebildeten Gase einwandfrei zu analysieren. Eine relativ einfache Vorrichtung, Erlenmeyer u. dergl. luftleer zu machen und hiernach zu beimpfen, hat BIFFI beschrieben.[3])

Alle diese Verfahren spielen praktisch nur eine geringe Rolle, da es mit sehr viel einfacheren Verfahren gelingt, den Sauerstoff von den Lebewesen bald mehr, bald minder vollkommen fernzuhalten: wir können den Sauerstoff mechanisch ausschließen, indem wir die Organismen mit festen oder gallertigen Körpern bedecken oder wir beseitigen den Sauerstoff, indem wir die über den Kulturen liegende natürliche Atmosphäre durch eine O-freie ersetzen oder wir bedienen uns chemischer Mittel, welche den vorhandenen Sauerstoff durch Absorption unwirksam werden lassen.

Am einfachsten ist es wohl, bei einer Plattenkultur durch Auflegen eines Deckglases oder eines Glimmerplättchens den Sauerstoff fernzuhalten. Die Methode ist recht roh, genügt aber oft, ist sogar für manche physiologische Untersuchungen sehr geeignet und liefert gute Demonstrationsobjekte, da auf den verschiedenen Teilen der Platte teils aërobe, teils anaërobe Existenzbedingungen verwirklicht sind. Handelt es sich um kleinere Kulturen auf Objektträgern, so verkittet man eventuell den Rand des Deckglases luftdicht. Natürlich haben diese Methoden viele Schwächen. — Im Prinzip ihnen ähnlich ist MARPMANNs Verfahren[4]): in die mit Gelatine oder Agar beschickten Reagensröhrchen wird ein zweites engeres, leeres, sterilisiertes Gläschen eingeschoben; es bildet sich zwischen beiden eine dünne Schicht des Nährsubstrats, auf welcher die Organismen vom Sauerstoff nicht erreicht werden. Ganz ähnliches erreicht man, wenn man die beiden Stücke einer Petrischale derart verwendet, daß der kleinere Teil der Schale (mit der offenen Seite nach oben) in den größeren eingesetzt wird; natürlich muß man vorher ausprobieren, wieviel Nährbodensubstanz in die Petrischalen einzugießen ist, damit keine Luftblase zwischen Deckel und Nährboden bleibt.

Um eine ähnliche Methode des Luftabschlusses handelt es sich bei BEYERINCKs Kugelröhre[5]), die bei Verwendung flüssiger Nährböden angemessen wird: auf der in einem Reagensglas eingefüllten Nährlösung

---

1) GRUBER, Üb. eine neue Meth. anaërob. Züchtung (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1898, **24**, 269).

2) ZUPNIK, D. Wachst. d. anaërob. Bakt. (ibid. I Orig., 1898, **23**, 1038, 1041).

3) BIFFI, U., Aussaat u. Züchtung der oblig. Anaëroben im luftleeren Raume (ibid. I Orig., 1911, **44**, 280).

4) Meth. z. Herstell. v. anaërob. Rollglaskult. usw. (ibid. I, 1898, **23**, 1090).

5) Vgl. BEYERINCK, M. W., Bildung u. Verbrauch von Stickoxydul durch Bakt. (ibid. II, 1910, **25**, 30).

schwimmt eine hohe Glaskugel, deren Durchmesser nur wenig geringer ist als der des Gefäßes. Der durch die Kugel bewirkte Luftabschluß ist selbstverständlich nur ein unvollkommener.

Kultur in hohen Schichten fester Nährböden (Gelatine, Agar) gestattet, wenigstens am Grunde der im Reagensglas ca. 15—20 cm hoch eingefüllten Masse die Organismen O-frei zu halten, da von der Oberfläche her durch Diffusion der Sauerstoff kaum so weit in die Tiefe dringt. Man impft die flüssige Substanz und läßt dann möglichst schnell erstarren.[1]) Die Methode gestattet, das Verhalten der an der Oberfläche gebliebenen und der im Innern der Gelatine eingelagerten Organismen zu vergleichen. WEICHSELBAUM[2]) überschichtet flüssige Nährmedien mit Agar; PASTEURS Methode, mit Öl zu überschichten, ist nicht zu empfehlen, da Öl immerhin beträchtliche Mengen von Sauerstoff passieren läßt.[3]) — Die Methoden der Überschichtung sind leicht auszuführen, werden aber lästig, wenn die im überschichteten Nährboden entwickelten Kolonien übergeimpft werden sollen. Gelatine kann man nach leichtem Erwärmen des Reagensglases in toto herausgleiten lassen, Agarröhrchen muß man aber zertrümmern, nachdem man vorher ihre Außenseite durch Waschen mit desinfizierenden Mitteln keimfrei gemacht hat.[4])

Großer Beliebtheit erfreut sich mit Recht die Methode, die über dem Kulturboden lagernde O-haltige Atmosphäre durch ein anderes indifferentes Gas zu ersetzen. Nachdem C. FRÄNKEL[5]) gezeigt hat, daß Kohlensäure oft schädlich auf die Mikroorganismen wirkt, kann nur noch Wasserstoffgas als allgemein zulässig in Betracht kommen. Um dieses völlig rein zu erhalten, leite man es aus dem KIPPschen Apparat zunächst in eine Waschflasche mit alkalischer Bleilösung, welche Schwefelwasserstoffspuren absorbiert, hiernach durch Silbernitratlösung (Tilgung des Arsenwasserstoffs) und schließlich durch alkalische Pyrogallollösung, welche die letzten O-Spuren zurückhält.[6]) Man leitet das Gas nach dem Impfen durch die in breite Reagensgläschen, Kolben oder dergl. eingefüllte Nährlösung oder in die noch flüssige Gelatine nach C. FRÄNKELS Angaben (a. a. O., S. 765): jedes Röhrchen

1) HESSE, Kultur in hohen Schichten fester Nährböden (Deutsche Medizinische Wochenschr. 1885, Nr. 14); LIBORIUS, Beitr. z. Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien (Zeitschr. f. Hyg. 1886, **1**, 115).

2) Beitr. z. Kenntnis der anaëroben Bakterien des Menschen (Zbl. f. Bakt. I, Orig., **32**, 401).

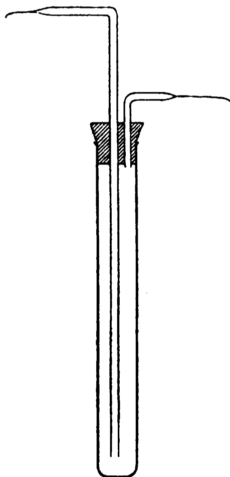
3) PASTEUR (C. R. Acad. Sc. Paris 1863, **56**, 418); FERMI u. BASSU, Untersuchungen über Anaërobiosis (Zbl. f. Bakt. I, Orig., 1904, **35**, 719).

4) SANFELICE, Untersuchungen über anaërobe Mikroorganismen (Zeitschr. f. Hyg. 1893, **14**, 346); ein besonderes Verfahren beschreibt BURRI: Zur Isolierung der Anaëroben (Zbl. f. Bakt. II, 1902, **8**, 533).

5) Die Einwirkung der Kohlensäure auf die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen (Zeitschr. f. Hyg. 1888, **5**, 332).

6) FRÄNKEL, C., Über die Kultur anaërober Mikroorganismen (Zbl. f. Bakt. 1888, **3**, 735, 763, besonders 768). MERESCHKOVSKY gewinnt chemisch reines H-Gas auf elektrolytischem Wege (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **11**, 796).

oder dergl. „wird mit einem gut schließenden, doppelt durchbohrten Kautschukpfropfen versehen, der zwei rechtwinkelig umgebogene Glasröhren trägt, von denen die eine bis auf den Boden des Reagensglases durch die Nährlösung hindurchreicht, während die andere unmittelbar unter dem Kautschukstöpsel abschneidet. An beiden Glasröhren ist vorher das wagrechte Stück in einem dünnen Halse ausgezogen worden. Die Fortsetzung des längeren Röhrchens enthält außerdem einen Bausch sterilisierter Watte und trägt an ihrem Ende einen kurzen Gummischlauch. Dieser letztere wird nun mit dem Wasserstoffentwicklungsapparat in Verbindung gebracht, das Gas streicht zunächst durch das im Reagensgefäß befindliche Nährsubstrat, durchströmt darauf das Reagensglas selbst und entweicht durch das zweite kurze Röhrchen. Ist die Luft vollständig verdrängt, so wird zunächst das kurze, hierauf das zuführende Rohr an dem ausgezogenen Halse abgeschmolzen, und der Nährboden dann, wenn es sich um Gelatine oder Agar-Agar handelt, an den Wandungen des Reagensglases in der von ESMARCH angegebenen Weise ausgebreitet. Nach einiger Zeit kommen die Kolonien in gleichmäßiger Verteilung über die Nährschicht zur Entwicklung" (vgl. Fig. 12). FUCHS[1]) verfährt so, daß das Reagensrohr nach der Impfung umgekehrt und von unten her H in dasselbe eingeleitet wird; nach einigen Minuten wird das Röhrchen von unten mit einem Gummistopfen fest verschlossen. Der BOTKINsche Apparat besteht im wesentlichen aus einer Glocke und einem unter sie genau passenden Drahtgestell, das eine Reihe von Petrischalen aufzunehmen vermag. Die Glocke steht in einer Schale, in welche so viel Paraffinum liquidum eingegossen wird, daß die Glocke hermetisch abgeschlossen ist; in ihr Inneres wird vom KIPPschen Apparat her H zugeleitet.


Fig. 12. Reagensglas zur Kultur anaërober Organismen in H.

Diese Methode ist nicht nur für Reagensgläser usw. passend, sondern auch für flache Schalen in geeigneter Weise modifiziert worden, worüber man die Arbeiten von KITASATO[2]) und GABRITSCHEWSKY[3]) nachlese.

Als Gas, mit welchem man die gewöhnliche Atmosphäre verdrängt, kommt neben H noch Wasserdampf in Betracht: der mit Organismen geimpfte Nährboden wird bei niederem Druck gekocht — etwa bei 30 oder 40° C (GRUBER[4]) u. a.) — oder man füllt die Reagensgläser bis zu $^2/_3$ ihrer Höhe mit Nährlösung und erhitzt bei unvermindertem Atmosphärendruck ihre obersten Schichten bis zum Sieden; die am Grunde liegenden Orga-

1) Ein anaërober Eiterungserreger. Dissertation. Greifswald 1890.
2) Über den Tetanusbazillus (Zeitschr. f. Hyg. 1889, **7**, 225, 227).
3) Zur Technik der bakteriol. Untersuchungen (Zbl. f. Bakt., 1891, **10**, 249).
4) Meth. d. Kultur anaërob. Bakt. (Zbl. f. Bakt. 1887, **1**, 367).

nismen bleiben — von empfindlichen Formen abgesehen — dabei unbeschädigt.[1])

Bei einer dritten Gruppe von Methoden sucht man den Sauerstoff durch Absorption zu entfernen. NENCKI[2]) und BUCHNER[3]) benutzten zuerst die Eigenschaft alkalischer Pyrogallollösung, O zu absorbieren, zur Beobachtung und Züchtung von Hefen und Bakterien. Die nach der Wirkung des Pyrogallols übrigbleibende Atmosphäre besteht aus N, CO_2 und kleinen Mengen CO, die bei dem Absorptionsvorgang entstehen (nach BOUSSINGAULT 0,4—3,4 % des Volumens des absorbierten Sauerstoffs). Die Absorption des Sauerstoffs erfolgt am schnellsten bei Anwendung folgender Mischung:

10 ccm 12,5 % ige Kalilauge und
10 „ 5 % ige Pyrogallollösung.

Soll vor allem die Bildung des CO vermieden werden, so nimmt man

6 ccm 60 % ige Kalilauge und
1 „ 25 % ige Pyrogallollösung.

Diese Mischung absorbiert den Sauerstoff bedeutend langsamer.[4]) Man verwendet die sauerstoffabsorbierende Lösung entweder in der Weise, daß man sie in einen irgendwie geformten, luftdicht verschließbaren Rezipienten schüttet, der gleichzeitig die Kulturgefäße in sich aufnimmt — oder Watte mit ihr durchtränkt und diese in die Kulturgefäße einführt. BUCHNER benutzte ca. 3 cm weite Röhrchen, in welche unten die Pyrogallollösung eingegossen wird; ein kleines Drahtgestell am Grunde (Abb. a. a. O.) gestattet, die Reagensglaskultur hineinzusetzen. Ebenso gestattet ein von OMELIANSKI (a. a. O.) konstruierter Apparat, anaërobe Organismen in den üblichen Reagensgläsern zu züchten. In den breiten Fußteil des Glases *A* (Fig. 13) werden je 10 ccm der Kalilauge und der Pyrogallollösung gegossen, das Reagensrohr wird eingesetzt und nach Aufsetzen des Gläschens *B* etwas Quecksilber in den Kragen

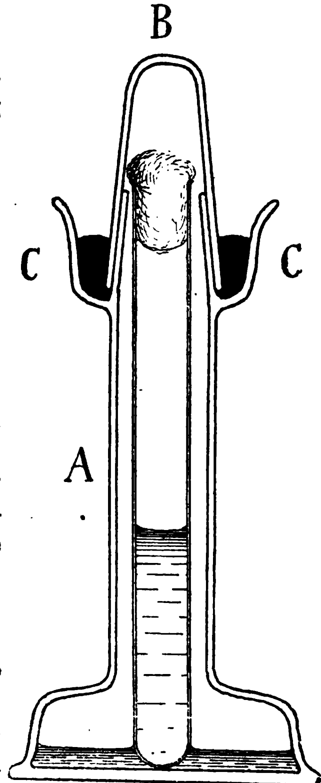


Fig. 13. OMELIANSKIS Apparat zur Anaërobenzüchtung.

1) REUSCHEL, FR., Die einfachste Methode der Anaërobenzüchtung (Münch. Mediz. Wochenschr. 1906, 1208).

2) Die Anaerobiosefrage (Arch. ges. Phys. 1884, **33**, 9; vorher bereits in Journ. f. prakt. Chemie 1879, **19**, 337).

3) Über eine neue Methode für Kultur anaërober Mikroorganismen (Zbl. f. Bakt. 1888, **4**, 149).

4) Nach OMELIANSKI, W., Ein einfacher Apparat für Kultur von Anaeroben im Reagensglas (ibid. II, 1902, **8**, 711).

C eingegossen. Die Absorption des Sauerstoffs, die erst nach 1½—2 Stunden vollständig beendet ist, läßt einen beträchtlichen negativen Druck in dem Gläschen entstehen; man gieße daher vor dem Öffnen erst das Quecksilber ab. Natürlich kann man mit Hilfe gut schließender größerer Glasdosen, Exsikkatoren oder dergl. die äußere Herrichtung des Versuchs beliebig variieren. Über die Benutzung von Petrischalen vgl. GABRITSCHEWSKY (a. a. O.), BLÜCHER, ARENS[1]) u. a.

Sehr bequem ist die Anwendung des WRIGHT-BURRIschen Verschlusses; Reagensgläser werden, wie aus Fig. 14 ersichtlich, mit einem dreifachen Verschluß versehen: über dem geimpften Nährboden (*N*) sitzt zunächst ein Stopfen von steriler, trockener, nicht hygroskopischer Watte (*W*), darüber folgt ein mit alkalischem Pyrogallol getränkter Stopfen aus hygroskopischer Watte (*P*) und schließlich ein Gummistopfen (*G*). Der Stopfen *P* wird mit 1 ccm einer 20 % igen Pyrogallussäure und 1 ccm einer 20% igen Kalilauge getränkt.[2])

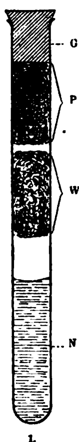


Fig. 14. WRIGHT-BURRIscher Verschluß (nach KÜRSTEINER).

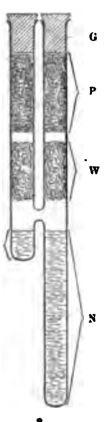


Fig. 15. KÜRSTEINERS Eprouvetten zur sauerstoffreien Impfung (nach KÜRSTEINER).

Um eine Impfung im O-freien Raume bewerkstelligen zu können, konstruierte KÜRSTEINER (a. a. O.) Reagensgläser von der in Fig. 15 dargestellten Form. Durch Neigen des Glases läßt man einen Teil der beimpften Lösung in die noch sterile überfließen. Bei dem in Fig. 15 links dargestellten Doppelglas läßt sich das Experiment natürlich nur einmal, bei dem andern (Fig. 15 rechts) mehrere Male ausführen.[3]) Die von KÜRSTEINER empfohlene Reagensglaskoppelung dürfte nicht nur bei Anaërobenkultur, sondern auch bei andern Aufgaben der Mikroorganismenerforschung gute Dienste tun.

Besondere Beachtung verdient noch NIKIFOROFFS Modifikation der Methode zur Kultur der Anaëroben im hängenden Tropfen.[4]) Man lege das Deck-

1) ARENS, Meth. z. Plattenkultur d. Anaëroben (Zbl. f. Bakt. 1894, **15**, 15); BLÜCHER, Eine Methode zur Plattenkultur anaërober Bakterien (Zeitschr. f. Hyg. usw. 1890, **8**, 499).

2) WRIGHT, J. H., A method for cultivation of anaërobic bacteria (Zbl. f. Bakt. I, **29**, 1901, 61). BURRI, R., Zur Isolierung d. Anaëroben (ibid. II, 1902, **8**, 533). KÜRSTEINER, J., Beitr. z. Untersuchungstechnik obligat anaërober Bakt. usw. (ibid. II., 1907, **19**, 1).

3) KÜRSTEINER, a. a. O. 1907.

4) Ein Beitrag zu den Kulturmethoden der Anaëroben (ibid. 489). Vgl. auch BRAATZ, Eine neue Vorrichtung z. Kultur v. Anaëroben im hängend. Tropfen (ibid. 1890, **8**, 520).

gläschen nach Einfettung und Impfung derart auf den Objektträger, daß dessen Vertiefung (s. o. S. 52) nicht ganz verschlossen wird. Dann „taucht man eine Platinöse in starke wässerige Pyrogallussäurelösung ein und bringt ein Tröpfchen der letzteren unter das Deckgläschen, indem man mit der Öse die zwischen dem Rande des Deckgläschens und demjenigen des Ausschliffs freigelassene Stelle betupft; er verbreitet sich dann durch Kapillarität der Tröpfchen als dünner Halbring da, wo Deckgläschen und Ausschliff sich berühren. Nach der Pyrogallussäure bringt man in derselben Weise, aber von der entgegengesetzten Seite des Deckgläschens her, nachdem man dasselbe genügend weit verschoben hat, ein Tröpfchen Kalilösung ein. Nachdem beide Reagentien vorsichtig eingeführt sind, verschiebt man das Deckgläschen so weit, bis es jetzt nach gewöhnlicher Weise den Ausschliff des Objektträgers vollständig schließt." Die eingeführte Menge der beiden Reagentien genügt vollkommen, um den Kulturraum unter dem Deckglas sauerstofffrei zu machen und zu erhalten.

Außer Pyrogallol + KOH wirken noch Mangansulfat + NaOH, Ferrosulfat + NaOH, Natriumhydrosulfit (SO_2Na_2) und andere[1]) sauerstoffabsorbierend.

Einige Autoren empfehlen, reduzierende Verbindungen dem Nährmedium selbst zuzusetzen: Kitasato und Weyl[2]) nehmen ameisensaures Natron (0,3—0,5 %), Trenkmann[3]) nimmt Schwefelnatrium (1—10 % tropfenweise zugesetzt). Ein eigenartiges Verfahren fand Tarozzi[4]): seine Beobachtung, daß anaërobe Organismen bei Gegenwart von freiem Sauerstoff gut gedeihen, wenn frische tierische oder pflanzliche Gewebsstücke (Leber, Niere usw.) in die Nährlösung gebracht werden, ist bereits von verschiedenen Autoren[5]) wiederholt und bestätigt worden.

Das Wesentliche und Wirksame sind dabei die reduzierenden Substanzen, die in den Organstücken usw. enthalten sind. Auch Gerstenkörner und andere Pflanzensamen, getrocknete tierische und pflanzliche Organe, selbst Holzkohle, Steinkohle und Koks tun ähnliche Dienste, wenn auch mit den drei letzteren (z. B. 0,01—2 g Steinkohle auf 10 ccm Bouillon) sich nur mäßig starke Kulturen gewinnen ließen.[6])

1) A. Meyer, Prakt. d. botan. Bakterienkunde, Jena 1903, 145.

2) Zur Kenntn. d. Anaëroben I (Zeitschr. f. Hyg. 1890, **8**, 41).

3) Eine Methode der Kultur anaërober Bakterien usw. (Zbl. f. Bakt. 1887, **1**, 367).

4) Tarozzi, G., Sulla biol. di alc. germi anaërobi e su di un facile mezzo di cultura dei medes. (Rif. med. 1905, **21**, 146, ferner Zbl. f. Bakt. I Orig., 1904, **38**, 619).

5) Wrzosek, A., Beob. üb. d. Beding. des Wachstums d. obligat. Anaëroben in anaërober Weise (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1906, **43**, 17), Bandini, P., Ric. sulla coltiv. degli anaërobi (Giorn. Accad. medic. Torino 1906, **12**), Harrass in M. Med. Wochenschr. 1906, Nr. 46 u. a.

6) Wrzosek, A., Weitere Unters. üb. d. Züchtung von obligat. Anaëroben in aërober Weise (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1907, **44**, 607), dort Literaturangaben.

PFUHL[1]) setzte zu demselben Zweck zu jedem Röhrchen Bouillon 1 g Platinschwamm oder je einen Tropfen Hepin (Behring-Werke) zu. —

Schließlich wäre noch des Verfahrens zu gedenken, daß man die Organismen ein geringes in den Kulturen verbliebenes Quantum Sauerstoff langsam verbrauchen läßt. Handelt es sich um Pilze, welche auch in O-haltiger Atmosphäre gedeihen, so läßt man sie in einem luftdicht verschlossenen, fast bis zum Rand mit Nährlösung gefüllten Gefäß zunächst aërob leben, bis sie den disponiblen Sauerstoff verbraucht haben und hiernach sich anaërob weiter entwickeln. Bakterien, welche streng anaërob sich entwickeln, gedeihen nach KEDROWSKI[2]) selbst auf der Oberfläche der Nährböden unter sauerstoffhaltiger Atmosphäre, wenn gleichzeitig mit ihnen O-verbrauchende Bakterien ausgesät werden und zur Entwicklung kommen.

Je nach den Mitteln, welche im Laboratorium zur Verfügung stehen, und nach den Aufgaben, welchen die Versuche dienen sollen, wird man die eine oder andere der angeführten Methoden zur Anwendung bringen oder mehrere von ihnen miteinander kombinieren. RŮŽIČKA[3]) z. B. verbrennt ca. $^4/_5$ des Sauerstoffgehaltes eines Kulturgefäßes mit einem Wasserstoffflämmchen und läßt den Rest von Pyrogallol resorbieren.

Was die Notwendigkeit aller dieser Maßnahmen für das Gedeihen einer Bakterienkultur betrifft, so ist zu erwägen, daß nach BURRI und KÜRSTEINER[4]) die üblichen Methoden der Anaërobenzüchtung nur die Bestimmung haben, durch Beseitigung des Sauerstoffs den allerersten Generationen der jungen Kultur die weitere Entwickelung möglich zu machen, da sich später die Bakterien selber die erforderlichen Verhältnisse schaffen: Versuche mit *Bacillus putrificus* zeigten, daß Beseitigung des WRIGHT-BURRIschen Verschlusses an 24stündigen Kulturen ihr Wachstum keineswegs zum Stillstand bringt, sondern ihm unverminderte Fortsetzung gestattet.

b) Kultur unter willkürlich zusammengesetzter Atmosphäre.

Um Organismen unter einer Atmosphäre von bekannter Zusammensetzung zu kultivieren und diese zur späteren Analyse gut zugänglich zu halten, verfährt SÖHNGEN[5]) folgendermaßen: Der Apparat besteht, wie Fig. 16 zeigt, aus zwei verbundenen Kolben von je ca. 300 ccm Inhalt. Der eine, in

---

1) PFUHL, E., Die Zücht. anaërober Bakt. in Leberbouillon usw. (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1907, **44**, 378).

2) Üb. d. Beding., unter welchen anaërobe Bakt. auch bei Gegenw. v. Sauerstoff existieren können (Zeitschr. f. Hyg. 1895, **20**, 366).

3) Eine neue einf. Meth. z. Herstellung sauerstofffreier Luftatmosph. usw. (Arch. f. Hyg. 1906, **58**, 327).

4) BURRI, R., u. KÜRSTEINER, J., Ein experim. Beitrag z. Kenntn. d. Bedeutung des Sauerstoffentzugs f. d. Entwickl. obligat. anaërober Bakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1908, **21**, 289).

5) SÖHNGEN, N. L., Über Bakt., welche Methan als Kohlenstoffnahrung u. Energiequelle gebrauchen (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **15**, 513); vgl. ferner BEYERINCK, M. W., Wirkung u. Verbrauch von Stickoxydul durch Bakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1910, **25**, 30, 54).

welchem die Kultur vor sich gehen soll (*A*), wird mit Kulturflüssigkeit ganz gefüllt und geimpft, dann wird durch den Gaszülaßhahn *B* so viel von einer bekannten Gasmischung zugelassen, daß die Lösung nur noch ca. 1 cm hoch steht und alles übrige durch ein Verbindungsrohr in den Kolben *D* hinübergepreßt ist. Man schließt hiernach den Mittelhahn *C* und den Gaszufuhrhahn *B*.[1])

c) Einfluß der Luftverunreinigungen auf Kultur und Organismen.

Die Laboratoriumsluft enthält allerlei Verunreinigungen — geformte und ungeformte. Von den geformten sind die freischwebenden Bakterien, Pilze, Hefen oder Algen die wichtigsten, die sich irgendwo von ihrem Substrat losgelöst haben und von minimalen Luftströmungen fortgetragen werden; sie bedrohen unsere Kulturen mit Verunreinigung und „Luftinfektion". Durch feste Wattestöpsel werden sie aber im allgemeinen recht gut ferngehalten — wie schon früher auseinanderzusetzen war. Anders steht es mit den ungeformten Verunreinigungen der Laboratoriumsluft. Nachdem namentlich O. Richter[2]) gezeigt hat, wie tiefgreifend die verdorbene Laboratoriumsluft auf Wachstums- und Gestaltungsprozesse der höheren Pflanzen wirken kann, wäre zu erwägen, ob ähnliche Störungen auch an Mikroorganismen auftreten können. Allerdings dürfte man derartige Giftwirkungen eher noch seitens der von den Mikroorganismen selbst produzierten Verunreinigungen erwarten: man denke an die Produktion von Schwefelwasserstoff, Trimethylamin, Indol, Merkaptan, Arsenverbindungen u. dgl. Unsere Kenntnis von der Wirkung solcher Gase auf die Mikroorganismen ist noch sehr unvollkommen. — Die typischen Verunreinigungen der Laboratoriumsluft sind auf unverbraucht ausströmendes Gas und namentlich auf die Verbrennung der

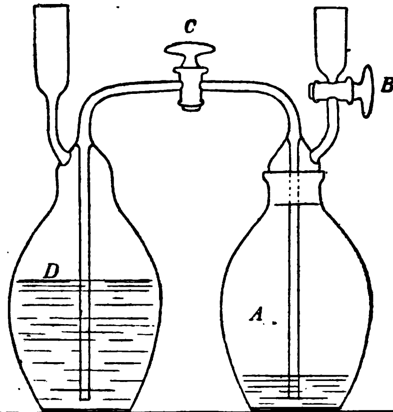


Fig. 16. Apparat zur Kultur unter beliebig zusammengesetzter Atmosphäre.

1) Einen „Apparat für die Kultur v. Bakt. bei hohen Sauerstoffkonzentrationen usw." beschreibt A. Meyer (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **16**, 386).

2) Über den Einfluß verunreinigter Luft auf Heliotropismus und Geotropismus (Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien Math.-naturwiss. Kl. I, 1906, **115**, 265).

N-haltigen Verunreinigungen des Leuchtgases[1]) zurückzuführen: durch diese entstehen beträchtliche Mengen salpetriger Säure.[2]) Außerdem sind in den Verbrennungsprodukten schweflige Säure und Schwefelsäure nachgewiesen worden.

Die Wirkung aller dieser Stoffe auf die Entwicklung der Kulturen bleibt im wesentlichen noch zu erforschen.

Die Wirkungen des Tabakrauches hat neuerdings Molisch[3]) eingehend untersucht.

Soll eine Kultur gelüftet werden, so muß man dafür sorgen, daß der mit Hilfe einer Wasserstrahlluftpumpe eingesogene Luftstrom erst durch ein Wattefilter geht und dabei keimfrei wird.[4])

6. Temperatur.

Aus den verschiedensten Gründen dürfen wir uns nicht immer damit begnügen, unsere Kulturen bei gewöhnlicher Zimmertemperatur zu halten; vor allem gibt es zahlreiche Lebewesen, die überhaupt erst bei höherer Temperatur zu wachsen anfangen. Ferner gehört es zu den Aufgaben der wissenschaftlichen Erforschung eines Organismus, festzustellen, welche Temperaturen er noch ertragen kann, ohne sein Wachstum einzustellen, wo sein Temperaturoptimum liegt, welche Temperaturkardinalpunkte seine verschiedenen Wachstums- und Gestaltungsprozesse bestimmen, welchen Einfluß die Temperatur auf seine Atmungstätigkeit, auf seine Ernährungsansprüche, überhaupt seinen ganzen Stoffwechsel usw. hat, ob der Organismus bei verschiedenen Temperaturen ungleiche Wuchsformen entwickelt[5]) u. dgl. m. Es ist daher unbedingt notwendig, die Organismen unabhängig von Wetter und Jahreszeit bei planmäßig gewählten Wärmegraden — und zwar bei konstanter Temperatur — kultivieren zu können. Wir bedienen uns hierzu der Thermostaten.

Thermostaten oder Brutschränke sind doppeltwandige Kästen aus Kupfer- oder Stahlblech, deren Inneres zur Aufnahme der Kulturgefäße usw. dient. Zwischen ihre beiden Wände wird Wasser eingefüllt und unten je nach Konstruktion des Apparats mit Gasbrenner, Petroleumlampe oder Kerze an-

1) Erismann, Unters. üb. d. Verunreinigung d. Luft durch künstl. Beleuchtung (Zeitschr. f. Biol. 1876, **12**, 315); Schilling, Handbuch der Gasbeleuchtung 90.

2) v. Bibra, Dissertation, München 1892.

3) Molisch, H., Üb. d. Einfl. d. Tabakrauchs auf die Pfl. (Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturw. Kl., Abt. I 1911.) Tassinari, Exper. Unters. üb. d. Wirkung des Tabaksrauchs auf die Mikroorganismen im allgemeinen usw. (Zbl. f. Bakt. 1888, **4**, 449).

4) Kompliziertere Vorrichtungen beschreibt z. B. Koch, A., Verschlüsse u. Lüftungseinrichtungen f. reine Kulturen (Zbl. f. Bakt. 1893, **13**, 252).

5) Wenn Organismen bei ungleichen Temperaturen verschiedene Wuchsformen entwickeln, so ist die Wirkung der ersteren wohl meist eine indirekte; bei Änderungen der Temperatur werden vor allem die Transpirationsverhältnisse der Organismen, die für deren Gestaltung bedeutsam sind, wesentlich geändert.

geheizt. Die Hauptsache ist der Thermoregulator oder die Vorrichtung, welche die Konstanz der Temperatur sichert. Es sind schon zahlreiche, zum Teil sehr sinnreiche Regulatoren dieser Art ausgesonnen und beschrieben worden. Ich beschränke mich darauf, die Quecksilberthermoregulatoren und die SARTORIUSsche Einrichtung zu beschreiben. Auch mit der letzteren habe ich seit Jahren gute Erfahrungen gemacht.

Die in Fig. 17 dargestellten Quecksilberthermoregulatoren sind nur anwendbar, wenn mit Gas geheizt werden kann. Der ALTMANNsche Regulator (Fig. 17a) wird mit seinem quecksilbergefüllten Fuß (*d*) in den Wasserraum des doppeltwandigen Brutschrankes eingelassen und das Gas in der Richtung der Pfeile durch den Apparat durchgeleitet, ehe es zum Brenner kommt. Der Flamme wird das Gas durch den offenen Hahn *e* und bei *a* vorüber zugeführt, so lange bis die Temperatur im Thermostaten hoch genug gestiegen ist, und das Quecksilber die Öffnung bei *a* schließt. Durch die Schraube *s* wird es ermöglicht, das Quecksilber so weit in die Röhre zurückzudrängen bzw. in ihr absinken zu lassen, daß gerade bei der gewünschten Temperatur die Quecksilbersäule die Gaszufuhr bei *a* unterbricht. Dann strömt nur weniger Gas zur Flamme (durch *e*); diese wird kleiner, das Quecksilber sinkt, und der Weg fürs Gas wird bei *a* wieder frei. Durch Drehung des Hahnes bei *e* kann man die Gaszufuhr so regulieren, daß die Sperrung bei *a* eine hinreichende Verkleinerung der Heizflamme herbeiführt.

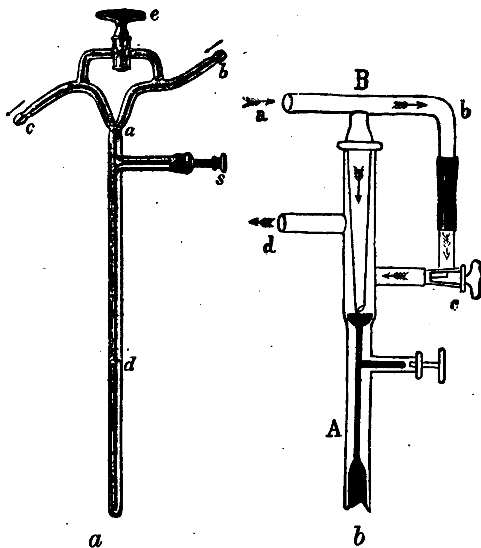


Fig. 17. Quecksilber-Thermoregulatoren.

Der (modifizierte) REICHERTsche Regulator, dessen oberer Teil in Fig. 17b dargestellt ist, besteht aus zwei Stücken, dessen oberes F-förmiges mit einem seiner Schenkel bei *B* in das andere eingefügt wird. Steigen die Temperatur und das Quecksilber hinreichend, so wird der Ausgangsporus dieses Schenkels verschlossen, und das Gas strömt nur noch auf dem Wege *abc—d* zur Flamme. *A* ist der mit Quecksilber gefüllte Fuß des Regulators. Alles übrige erklärt sich nach dem Gesagten aus der Figur von selbst.

Die von SARTORIUS (Göttingen) konstruierten Thermostaten haben den Vorzug, daß jede beliebige Heizflamme zum Betrieb des Apparats ausreicht: bei allzu hoher Temperatur im Thermostaten wird nicht die Heizflamme verkleinert, sondern die überschüssige Wärme abgeleitet. Rechts unten (Fig. 18)

steht die Petroleumlampe, welche die im Rohre *s* enthaltene Luft kräftig anheizt und Wärme in das von *s* ausgehende Rohr *CC* gelangen läßt, das den Wasserraum des Thermostaten (*W*) durchzieht. Steigt die Temperatur zu hoch, so tritt die Kapsel *K* in Tätigkeit. Diese ist so konstruiert, daß sich bei Volumänderung nur ihre obere konvexe Fläche hebt oder senkt. Ein auf der Kapsel ruhender vertikaler Stift überträgt die Bewegungen der Kapselwand auf den Hebel *h*, der beim Steigen den Deckel *d* vom Rohr *s* wegzieht, so daß die heiße Luft oben abströmt, anstatt von *C* aus den Thermostaten zu heizen. Allmählich tritt Abkühlung ein, der Hebel senkt sich. Die Klappe schließt sich wieder, und das Rohr *C* wird wieder geheizt. Beim Einstellen des Thermostaten verfährt man in der Weise, daß man das verschiebbare Gewicht *g* so einstellt, daß der Deckel bei der gewünschten Temperatur gerade schwebend über dem Heizrohr gehalten wird.

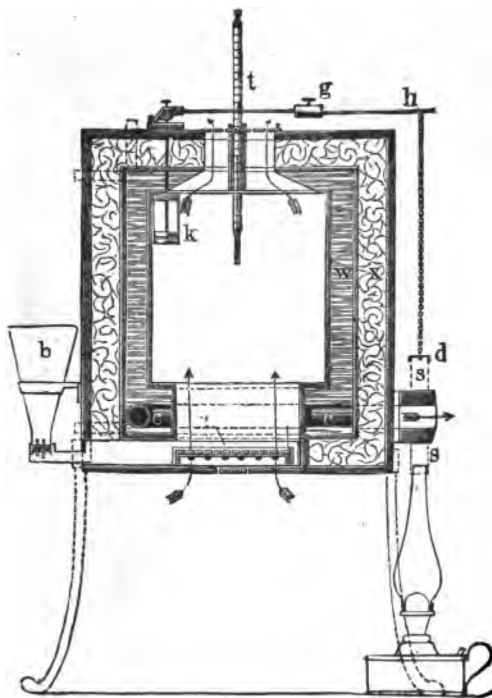


Fig. 18. Thermostat nach SARTORIUS.

Steht kein Thermostat zur Verfügung, so kann man sich zur Not mit einem doppeltwandigen Trockenschrank begnügen: der Raum zwischen den beiden Wänden wird mit Wasser gefüllt und das Ganze angeheizt, bis die gewünschte Temperatur erreicht ist; um diese zu erhalten, genügt weitere Heizung mit einem kleinen Brenner, dessen Flamme man mit einem Glimmerzylinder schützt.

Sollen Organismen kürzere oder längere Zeit hindurch besonders hohen Temperaturen ausgesetzt werden, so hilft MEYERS Apparat[1]): die Kulturgefäße werden in ein Wasserbad getaucht, das von einem doppeltwandigen Metallmantel umschlossen ist; letzteren füllt man mit Flüssigkeiten, deren Siedepunkt der gewünschten Temperatur entspricht:

für 60°	Chloroform	für 136°	Xylol
70°	Methyl-Äthylalkohol 3 : 7	150°	Anisöl
75°	Äthylalkohol	161°	Kumol
80°	Äthyl-Propylalkohol 7 : 4	180°	Anilin
90°	dass. 1 : 8	200°	Naphtalin
97—100°	Wasser	300°	Diphenylamin.

Ein Rückflußkühler sorgt dafür, daß die siedende Flüssigkeit sich nicht vermindere.

1) Näheres bei MEYER, A., Prakt. d. botan. Bakterienkunde, Jena 1903, 129.

Die beschriebenen Vorrichtungen können natürlich nur Temperaturen schaffen, welche höher liegen, als die Zimmertemperatur; will man tiefer liegende Temperaturgrade herstellen, so läßt man die Kulturgefäße entweder von Leitungswasser dauernd umspülen, oder man bringt sie im Eisschrank unter. Einen Thermoregulator für niedere Temperaturen konstruierten z. B. BABES[1]) und KUNTZE[2]).

7. Licht.

Das Verhältnis der Mikroorganismen zum Licht ist ein sehr verschiedenes. Die chlorophyllhaltigen unter ihnen brauchen es, da sie nur bei Belichtung Kohlensäure zu verarbeiten imstande sind; dabei ist aber ihre Abhängigkeit vom Licht insofern anders als die der höheren Pflanzen, als sie bei geeigneter Ernährung auch im Dunkeln Chlorophyll bilden können. Auf viele farblose Organismen — Bakterien — wirkt Belichtung entwicklungshemmend, unter Umständen so stark, daß man geradezu von einer Sterilisation durch Licht sprechen kann (s. o. S. 48). Pilzen gegenüber sind Licht und Dunkelheit insofern von größtem Einfluß, als bei Lichtabschluß Wachstum und Organbildung bei ihnen oft ganz anders ausfallen als im Hellen. Darin ist aber wiederum nicht ein spezifischer Einfluß, sondern eine mittelbare Wirkung des Lichtes zu suchen, durch welches die Transpirationsverhältnisse ganz wesentlich beeinflußt werden. Belichtung und Verdunkelung sind für den Forscher oftmals die einfachsten Mittel, um bestimmte Erscheinungen, Wuchsformen usw. an den kultivierten Organismen hervorzurufen.

Das Technische bedarf keiner besonderen Ausführlichkeit. Dunkelzimmer kann man durch Schränke mit gut schließenden Türen oder noch kleinere Behälter jederzeit leicht ersetzen; die Richtung, in welcher die Lichtstrahlen die Organismen treffen sollen, reguliert man durch lokale Umhüllung des Kulturgefäßes mit lichtdichten Materialien; zur Abblendung der von unten oder der seitlich einfallenden Strahlen bedient man sich mit Vorteil des zur Verpackung der photographischen Platten gebrauchten schwarzen Papiers. Bei Versuchen über die Wirkung konstanter Belichtung wird meist keine andere Lichtquelle als eine Gas- oder Glühlampe erforderlich sein.

Für monochromatisches Licht sorgen die in pflanzenphysiologischen Laboratorien seit langem üblichen SENEBIERschen doppeltwandigen Glocken, die z. B. mit Kaliumbichromat bzw. Kupferoxydammoniaklösung für rotes bzw. blaues Licht gefüllt werden. Große Auswahl in Farbentönen steht bei Verwendung von Anilinfarben zur Verfügung. Meinhold bediente sich folgender Farben[3]):

---

1) Über einige Apparate z. bakteriol. Untersuch. (Zbl. f. Bakt. 1888, **4**, 19).
2) Ein Thermostat für niedrige Temperatur (ibid. II, 1907, **17**, 684). Über LAUTENSCHLÄGERS Modell vgl. ferner GRIJNS, G. (ibid. I Orig., 1902, **31**, 430).
3) MEINHOLD, TH., Beitr. z. Phys. d. Diatomeen (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1911, **9**, 353).

für rot:	Neutralrot in H_2O
rotgelb:	Methylorange in H_2O
orangegelb:	Safranin in $CuSO_4$-Lösung
gelb:	Bismarckbraun in konz. $CuSO_4$-Lösung
blaugrün:	Berliner Blau in Oxalsäurelösung
hellblau:	Säuregrün + Methylgrün in $CuSO_4$-Lösung
dunkelblau:	Paramethylblau in $CuSO_4$
violett:	Methylviolett + Methylenblau in $CuSO_4$

Stehen nicht genügend SENEBIERsche Glocken zur Verfügung, so taucht man die beimpften Reagensglaskulturen u. ähnl. in hinreichend hohe, mit farbigen Lösungen beschickte Standgläser; der vom Tageslicht getroffene obere Teil der letzteren wird mit schwarzem Papier zugebunden. In manchen Fällen kann man sich damit helfen, daß man die feuchte Kammer an allen dem Lichte zugänglichen Teilen mit farbigem Glas bedeckt oder mit farbigem „Gelatinepapier" einkleidet. Dieses ist in verschiedenen Farben erhältlich; eine der käuflichen Sorten entspricht in der Tönung einer Kaliumbichromatlösung. Auch gläserne Kulturgefäße irgendwelcher Art kann man mit derartigem „Papier" einhüllen oder kann sie mit gefärbter flüssiger Gelatine anstreichen.

Monochromatisches Glas wird in Jena (SCHOTT) hergestellt.

Eine besondere Art der Lichtwirkung ist die von TAPPEINER und seinen Schülern studierte photodynamische, die von fluoreszierenden Lösungen ausgeht.[1]) In verdünnten Lösungen fluoreszierender Stoffe (Eosin u. a.) starben Mikroorganismen bei Belichtung sehr viel früher ab, als bei Lichtabschluß.

Bringt man z. B. zu einem Tropfen aus einer Paramaezienkultur einen Tropfen Lösung folgender Chloride (1 : 20 000),

	bei hellem Tageslicht	bei trübem Tageslicht
so tötet Akridin	nach 30 Minuten	nach 105 Minuten
Phenylakridin	„ 28 „	„ 90 „
Rheonin[2])	„ 23 „	„ 90 „
Akridinorange[3])	„ 15 „	„ 75 „

8. Verdunstung und Transpiration, Schüttelvorrichtungen und strömende Nährböden.

Alle Kulturen müssen so eingerichtet sein, daß auch bei Anwendung fester Nährböden den Organismen eine genügende Menge Wasser in diesen[4]) erhalten und die über ihnen liegende Atmosphäre wasserdampfreich bleibt.

---

1) Vgl. namentlich TAPPEINER, H. v., u. JODLBAUER, A., Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen, Leipzig 1907.

2) Tetramethyltriamidophenylakridin.

3) Tetramethylphenyldiamidoakridin.

4) Über das Minimum an Wassergehalt, das Organismen erfordern, vgl. z. B. WOLF, L., Über den Einfluß des Wassergehaltes des Nährbodens auf das Wachstum der Bakterien (Arch. f. Hyg. 1899, **34**, 200).

Bei Besprechung der verschiedenen Formen, die einer Kultur gegeben werden können, war schon von den Mitteln, durch welche man diese Ziele erreicht, die Rede. Es hat sich nun herausgestellt, daß der Grad der Luftfeuchtigkeit und die davon abhängige Wasserdampfabgabe seitens der Organismen auf deren Wachstumstätigkeit und ihre Wuchsformen von größter Bedeutung sind.

Den Grad der Transpiration der Organismen von Fall zu Fall beurteilen und regulieren zu können, wäre sehr wünschenswert, ist aber nicht leicht. Die Transpiration ist abhängig von dem Wasserdampfgehalt der die Organismen umgebenden Atmosphäre, sowie von der Temperatur der Organismen und ihrer Umgebung; sie wird beeinflußt in erster Linie von Licht und Dunkelheit insofern, als Licht die Transpiration fördert, ferner von Luftbewegungen, welche immer neue, noch nicht mit Wasserdampf gesättigte Luftschichten in die nächste Nähe der H_2O-abgebenden Organismen bringen, und von manchen andern Faktoren. Der Feuchtigkeitsgehalt eines Luftraums, der beispielsweise unter einer Glasglocke liegt, wird bestimmt durch die Wassermenge, die innerhalb der Glocke vorhanden ist und bei genügend hoher Temperatur verdunsten kann, und von der unter der Glasglocke herrschenden Temperatur, welche bald die Verdunstung fortschreiten, bald den Dampf sich wieder kondensieren läßt. Ungleichmäßige Erwärmung, wie sie durch Besonnung oder durch die Nähe eines geheizten Ofens zustande kommt, oder lokale Abkühlung durch ein nahes Fenster führen sofort zu ungleichmäßiger Wasserdampfverteilung innerhalb des Kulturraums, auf welche z. B. Pilze sehr drastisch reagieren können.

Will man Organismen in dampfgesättigtem Raum kultivieren, so wird man das Kulturgefäß möglichst klein wählen und seine Wände durch angelegtes benetztes Filtrierpapier feucht halten; will man den Organismen eine möglichst trockene Atmosphäre geben, sie aber nicht unbedeckt lassen, so wird man sich durch Einsetzen kleiner, mit Chlorkalzium gefüllter Gefäße zu helfen suchen. Kommen die Gefahren einer Luftinfektion nicht sonderlich in Betracht, so bedeckt man die Schalenkulturen mit Scheiben, die die Kultur nur halb decken, oder verwendet Glasdeckel mit eingeschliffenem Loch. Soll durch Luftbewegung im abgeschlossenen Raum die Transpiration gesteigert werden, so stülpt man über die Kultur eine an der Spitze oder an der Seite tubulierte Glasglocke und führt durch diese eine Achse ein, an deren Ende ein Flügelrad befestigt ist. Die Achse wird durch einen Motor (Anschluß z. B. an einen Akkumulator) in Drehung gebracht. — Selbst bei einer sonst nur mäßig feuchten Atmosphäre wird z. B. bei Kultur eines Pilzes über der Pilzdecke doch stets eine besonders wasserdampfreiche Luftschicht lagern. Die Transpiration der Organismen völlig zu unterdrücken, wird aber trotzdem schwer sein, da auch im dampfgesättigten Raum die Eigenerwärmung der atmenden Organismen immer wieder kleine Temperaturdifferenzen und damit Destillationsprozesse herbeiführt. Beyerinck[1]) schlägt vor, Petrischalen

1) Verfahren z. Nachweise d. Säureabsonderung bei Mikrobien (Zbl. f. Bakt., 1891, **9**, 781).

oder irgendwelche Dosen, in welchen Organismen auf festen Nährböden kultiviert werden, verkehrt, d. h. mit dem Deckel nach unten, auf einen mäßig warmen Thermostaten oder dergl. zu legen; der Teil der Dose, der diesem aufliegt, bleibt dann etwas wärmer, als der die Organismen tragende Teil. —

Ebenso wie die Atmosphäre wird man für besondere Zwecke auch die Nährlösung in Bewegung halten müssen. Bei offenen, vor Luftinfektion nicht geschützten Algen- usw. Kulturen genügt eine Rührvorrichtung, bei geschlossenen Kulturen ist ein mit der Hand oder besser elektrisch betriebener Schüttelapparat notwendig.[1]) Bei der Wirkung dieser Behandlung auf die Organismen sind offenbar verschiedenartige Faktoren im Spiel: einmal die bessere Luftversorgung, die sich in flüssigen Nährmedien durch Schütteln und Erschüttern erreichen läßt, ferner die gleichmäßigere Verteilung der von den Organismen gelieferten Stoffwechselprodukte und der mechanische Effekt der Stöße, welche die Entwicklung aufhalten und modifizieren; Lucet nimmt an, daß beim Schütteln auch bestimmte Stoffe (Endotoxine) besonders leicht aus den Zellen herausdiffundieren.[2]) Ein Beispiel für die Wirkung besserer O-Versorgung ist wohl mit Karstens *Sceletonema*kulturen gegeben: in bewegtem Wasser erlangen die Diatomeen ihre normale Ausbildung, in stehendem bleiben gewisse Differenzierungen aus[3]), während z. B. bei Rays Versuchen mit *Sterigmatocystis* es sich in erster Linie um eine Hemmung der Entwicklung durch rein mechanische Faktoren handeln dürfte, wenn der Pilz sklerotienartige Ägagropilenkugeln mit dicken Zellwänden und einer Art Pseudoparenchym entwickelt.[4]) Daß sich durch Schüttelkulturen noch manche beachtenswerte Resultate erzielen lassen werden, ist nicht zweifelhaft.

Soll in strömendem Wasser kultiviert werden, so kann man sich bei Süßwasseralgen leicht dadurch helfen, daß man das Kulturgefäß — nötigenfalls mit Gaze verbunden — unter den Wasserleitungshahn stellt. Schwieriger ist die Forderung zu erfüllen, wenn mit bestimmten Nährlösungen und besonders mit sterilem Nährlösungsmaterial gearbeitet werden soll; Weleminsky[5]) hat einen Apparat beschrieben, welcher das gestattet.

---

1) Vgl. z. B. Bodin u. Castex, Appareil pour l'agitation continue des cultures (Ann. Inst. Pasteur 1904, **18**, 263), Sartory, A., Etudes expér. de l'infl. de l'agitation s. l. champign. inférieurs. Thèse. Paris 1908 (betrifft *Aspergillus niger*).

2) Lucet, A., De l'infl. de l'agit. sur le dével. du *Bac. anthr.* cult. en mil. liquide (C. R. Acad. Sc. Paris 1911, **152**, 1512.

3) Die Formveränd. v. *Sceletonema costatum* usw. (Wissensch. Meeresunters., Abt. Kiel, 1898, **3**, 13).

4) S. le dével. d'un champignon dans un liquide en mouvement (C. R. Acad. Sc. Paris 1896, **123**, 907).

5) Über Züchtung von Mikroorganismen in strömenden Nährböden (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1906, **42**, 280, 376). Vorher stellte Wiener (Apparat z. Züchtung v. Mikroorganismen in bewegl. flüss. Medien, ibid. I, 1903, **34**, 594) ähnliche Versuche an.

9. Nachweis und Wirkung der Stoffwechselprodukte.

Von unermeßlicher Mannigfaltigkeit sind die Stoffwechselprodukte, die in den Nährböden der Mikroorganismen nachweisbar werden und die weitere Entwicklung der Mikroben wesentlich beeinflussen können.

Daß die Stoffwechselprodukte, die in alternden oder selbst schon in mehrtägigen Kulturen nachweisbar werden, von den lebenden Mikroorganismen ausgeschieden worden sind, darf keineswegs ohne weiteres angenommen werden; möglicherweise handelt es sich bei jenen um Stoffe, die aus toten Zellen exosmiert sind oder durch Einwirkung der lebenden Zellen auf die von toten Anteilen gelieferten Stoffe entstanden sind. Tatsache ist, daß auch in lebhaft vegetierenden Kulturen von geringem Alter neben lebenden Anteilen sich beträchtliche Mengen toten Materials finden können.

Das Studium der Stoffwechselprodukte kann auf verschiedenen Wegen in Angriff genommen werden: entweder wir richten die Kultur — durch geeignete Wahl von Nährstoffen oder charakteristisch reagierenden Beimengungen — derart ein, daß wir während der Entwicklung der Mikroorganismen bereits über Entstehung und Qualität der Stoffwechselprodukte informiert werden — oder wir trennen früher oder später den Nährboden von den Organismen und suchen mit den üblichen Hilfsmitteln des chemischen Laboratoriums zu ermitteln, was für Stoffe sich in dem Nährsubstrat finden. Die Trennung der Substrate von den Lebewesen wird, wenn es sich um relativ großzelliges Material handelt, mit einem Papierfilter bewerkstelligt werden können. Bedient man sich einer Filterkerze (s. o. p. 49), so ist zu beachten, daß die absorbierende Kraft der Kerzensubstanz die Flüssigkeit nicht immer unverändert durchs Filter laufen läßt.[1]) Das gewonnene Filtrat ist wegen der Empfindlichkeit gewisser Stoffwechselprodukte gegenüber physikalischen Agentien (Thermo- und Photolabilität) mit Vorsicht zu behandeln.[2])

Bei der nachfolgenden Aufzählung der verbreitetsten Stoffwechselprodukte werden wir namentlich auf diejenigen Mittel und Wege eingehen, welche Anwesenheit und Wirkung der Stoffwechselprodukte von der Kultur selber abzulesen gestatten. —

Hinsichtlich der Reaktion der von den Organismen ausgeschiedenen Stoffe und der Einwirkung der Organismen auf die Reaktion des Nährbodens lassen sich Säurebildner und Alkalibildner unterscheiden. Besonders die Säurebildner spielen eine große Rolle, und zu ihrem Nachweis sind verschiedene Methoden beschrieben worden. Entweder wir mischen zu dem Nährboden Stoffe, welche bei Säurewirkung eine Farbenänderung erfahren (Indikatoren), oder wir setzen dem Substrat wasserunlösliche Stoffe zu, die mit Säure wasser-

---

1) Nach Porter verlieren manche Fermente bei Berührung mit einer Kollodiummembran ihre Wirksamkeit (Biochem. Ztschr. 1910, **25**, 301).

2) Einen namentlich für mykologische Untersuchungen geeigneten Apparat zur Untersuchung der Stoffwechselprodukte beschreibt Schouten (Eine modif. Meth. u. ein neuer App. f. Enzymunters. Zbl. f. Bakt. II, 1907, **18**, 94), vgl. auch das unten zu Fig. 22 u. 23 gesagte.

lösliche Verbindungen geben. An das zweite Prinzip knüpft BEYERINCKS[1]) Methode an. Nach dem Vorschlag dieses Autors benutzen wir einen Kreidegelatinenährboden: die mit beliebigem Nährmaterial hergestellte Gelatine (oder auch Agarmasse) wird mit feiner, geschlämmter Kreide zu einem undurchsichtigen, milchweißen Brei angerührt; selbst in einer Schicht von nur 1 mm Dicke muß die Nährgelatine undurchsichtig bleiben. Nach dem Erstarren trägt man die zur Untersuchung bestimmten Organismen auf die Gelatineplatte auf oder übergießt sie mit der zur Prüfung vorliegenden organismenhaltigen Flüssigkeit. Überall, wo sich säurebildende Bakterien usw. entwickeln, entstehen durch Lösung der Kreide durchsichtige Diffusionsfelder. BEYERINCK macht darauf aufmerksam, daß die Methode sehr empfindlich ist und selbst den Nachweis von Bernsteinsäure gestattet. Fig. 19 zeigt oben den Durchschnitt durch eine verkehrt liegende Gelatinedose, unten die Fläche derselben Gelatinekultur, auf der sich Säurebildner entwickelt haben. Die Kultur *a* gehört einem alkalibildenden Organismus an, der das Säurediffusionsfeld der danebenliegenden säureerzeugenden Kolonie *S* teilweise neutralisiert. Außer diesen Beziehungen der Organismen zueinander lassen sich bei aufmerksamer Musterung noch manche andere von den Kreidegelatineplatten ablesen.[2]) —In ähnlicher Weise wie Kreide kann man auch die Karbonate von Magnesium, Baryum, Mangan, Zink u. a. verwerten.[3])

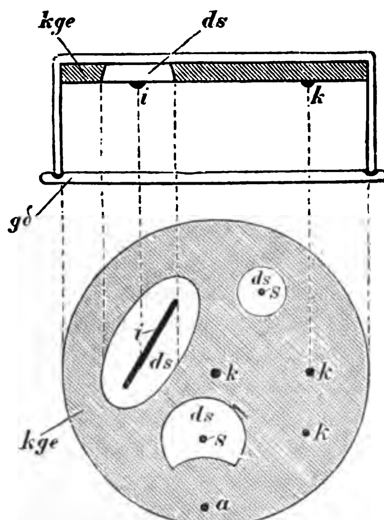


Fig. 19. Nachweis säurebildender Organismen (nach BEYERINCK). *gd* Glasdeckel. *kge* Kreidegrund. *i* Impfstrich, *ds* Diffusionsfeld, *S* Säurebildner, *a* Alkalibildner, *k* Kulturen von Organismen, welche die Reaktion des Nährbodens nicht verändern.

1) Verfahren zum Nachweise der Säureabsonderung bei Mikrobien (Zbl. f. Bakt. 1891, **9**, 781).

2) Sät man auf glukosehaltiger Gelatine mit Maische etwa Hefen, Essigsäure- und Milchsäurebakterien gleichzeitig aus, so diffundiert der von den Hefen gebildete Alkohol allmählich durch die Gelatine vorwärts und veranlaßt schnelle Vergrößerung der von den Essigsäurebakterien gebildeten Glukonsäurefelder, während die Diffusionszonen der Milchsäurebakterien keine Zunahme ihrer Ausdehnungsschnelligkeit erfahren (BEYERINCK).

3) „Besonders das Zinkkarbonat eignet sich zur leichten Erkennung gewisser Formen. So sind die Milchsäurebakterien diesem Salz gegenüber ziemlich empfindlich, besonders bezüglich des Wachstums, während die Funktion der Säurebildung in den erwachsenen Stäbchen weniger durch dieses Metall beeinflußt wird. Die Essigfermente sind dagegen auch betreffs des Wachstums nicht empfindlich für die bei unseren Versuchen in Betracht kommenden Quantitäten des Metallsalzes. Endlich wird die von mir aufgefundene Essigätherhefe, welche auch viel freie Säure bilden kann, in ihrem Wachstum entschieden durch die Gegenwart eines Zinksalzes begünstigt" (BEYERINCK a. a. O., 785).

Von Indikatoren kommen besonders Phenolphtaleïn und Lakmus in Betracht. Will man mit ersterem arbeiten, so verdünnt man eine 0,5 %ige Lösung (in 50 %igem Alkohol) auf $^{1}/_{20}$ ihrer Konzentration und setzt von dieser Lösung je 0,7—0,8 ccm zu 5 ccm Nährlösung.[1]) Beliebter ist Lakmus. BUCHNER[2]) hat zum ersten Male die Verwendbarkeit des letzteren dargetan: säurebildende Organismen, die auf alkalischem blauen Nährboden ausgesät werden, rufen lokale Rotfärbung hervor. PETRUSCHKY[3]) benutzte besonders Lakmusmolke und gibt ausführliche Anweisung zu deren Herstellung. Da sich verschiedene Mikroorganismen auf Lakmusnährboden als Alkali- bzw. Säurebildner sehr verschieden verhalten, dient Lakmusmolke oder dergl. sowie der Grad der Reaktionsänderung innerhalb gegebener Zeit als diagnostisches Hilfsmittel. Typhus z. B. ist als schwacher Säurebildner gekennzeichnet.

P. KAUFMANN[4]) empfiehlt zur Unterscheidung der Säure- und Alkalibildner einen aus Jequiritysamen (*Abrus precatorius*) hergestellten Nährboden. Die Samen[5]) werden geschält, zerstampft und das Pulver im Dampftopf zwei Stunden gekocht (8 g in 100 ccm Wasser). Die Jequiritylösung ist hellgelb, reagiert neutral oder schwach alkalisch und kann ohne weiteres verarbeitet werden; Alkalibildner rufen Grünfärbung, Säurebildner Entfärbung hervor.

Alkalisch wirkende Stoffe, die von den Organismen gebildet werden, weist man schließlich mit Hilfe eines fuchsingefärbten Nährbodens nach. Fuchsin wird durch basische Verbindungen entfärbt; Zusatz von Säure stellt die rote Farbe wieder her. Über die vielfältige Verwendung, welche die Anilinfarben bei der Herstellung von Nährböden finden, wird später bei Behandlung der Bakterien noch besonders ausführlich zu berichten sein.

Kreide, die man zum Nährboden gibt, gestattet nicht nur den Nachweis der Säurebildung, sondern auch die Bindung entstandener Säure, die man mit Kalziumkarbonat, Magnesia usta u. dgl. auch nachträglich durch Aufstreuen auf das Nährsubstrat — oder einen Teil der Kulturfläche — erreichen kann. Soll die Reaktion eines Nährbodens dauernd sauer bleiben, so hilft man sich durch Beigabe von Weinstein, Harnsäure oder anderer schwer löslicher saurer Verbindungen. —

Eine Methode, welche sehr kleine Mengen Alkohol (0,001—0,002 vol. proz.) in Nährlösungen nachzuweisen gestattet, beschreibt KLÖCKER: in ein Reagensglas von 180 mm Länge und 24 mm Durchmesser werden 5 ccm der Flüssigkeit gebracht; in den durchbohrten Stöpsel des Rohres wird ein 80 ccm langes, 3 mm (auswendig!) breites Rohr gesteckt, dessen unteres Ende gerade

1) ZILLIECKY, R., Biochem. u. differentialdiagnostische Unters. einiger Bakt. mittels Ph.-Nährböden (Zbl. f. Bakt. Orig., 1902, **32**, 752).
2) Zur Kenntnis des Neapeler Cholerabazillus usw. (Arch. f. Hyg. 1885, **3**, 361).
3) Bakteriochemische Untersuch. (Zbl. f. Bakt. 1889, **6**, 657; 1890, **7**, 1).
4) Über einen neuen Nährboden f. Bakterien (Zbl. f. Bakt. 1891, **10**, 65).
5) Werden von MERCK-Darmstadt geliefert.

durch den Stöpsel reicht. Dann wird über einem Drahtnetz das Gefäß langsam erwärmt; Stoßen und starkes Schäumen der Flüssigkeit ist zu vermeiden. Ist Alkohol in ihr, so schlagen sich im Rohre runde ölartige Tropfen nieder; je höher der Alkoholgehalt, um so weiter reichen die Tropfen im Rohre herunter.[1])

Vermutlich ist es Chinon, welches nach BEYERINCK in neutralen Medien eine Schwärzung von Ferro- und Ferrisalzen hervorruft.[2]) BEYERINCK beobachtete solche Wirkungen bei Kultur von Pilzen (*Actinomyces chromogenes*) und Bakterien (*Acetobacter melanogenum*) auf eisenhaltigen Nährböden. Dieselbe Substanz bedingt auffallende Veränderung der Gelatine: diese wird durch die Mikroorganismen gegerbt, d. h. sie verliert ihre Löslichkeit im kochenden Wasser und ihre Peptonisierbarkeit bei Trypsineinwirkung.

Die Bildung von Schwefelwasserstoff[3]) weist BEYERINCK dadurch nach, daß er zu (alkalischem) Fleischagar oder -gelatine vor dem Plattengießen so viel Bleiweiß (Bleikarbonat) zusetzt, daß eine gleichmäßig weiße, undurchsichtige Masse entsteht. Gießt man auf solche Nährböden z. B. eine Probe von Grabenwasser aus, so machen sich diejenigen Kolonien, welche Schwefelwasserstoff entwickeln, durch ihre braune Farbe den ungefärbten Kolonien gegenüber auffallend (Bildung von Schwefelblei). Besonders markant wird die Erscheinung, wenn man auf ältere Kulturen sterilisierte Glasplatten auflegt und dadurch die Verflüchtigung des Schwefelwasserstoffs hemmt. — Vom Indol und seinem Nachweis wird später bei Besprechung der Bakterien die Rede sein.

Bei der Benutzung des Lakmus und anderer Indikatoren ist wohl zu beachten, daß Farbenveränderungen und schließlich Entfärbung auch durch die reduzierende Wirkung der Organismen zustande kommen können. Nach BEHRING[4]) läßt sich diese entfärbende Wirkung bei Züchtung von Bakterien auf Lakmusagar leicht beobachten, bei Lakmusgelatine fast garnicht und bei Lakmusbouillon nicht gut erkennen. MÜLLER benutzte zum Nachweis der reduzierenden Wirkung der Organismen neben Indigkarmin hauptsächlich essigsaures Rosanilin und Methylenblau, besonders auf Agar. Zu beachten ist, daß Agar beim Kochen kräftig zu reduzieren vermag. Mit Aërobiose und Anaërobiose hat die reduzierende Wirkung der Mikroben nach MÜLLER nichts zu tun.[5])

---

1) KLÖCKER, A., Über den Nachweis kleiner A.-Mengen in gärenden Flüssigkeiten (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **31**, 108); seine Methode ist eine Modifikation der älteren PASTEURschen Tropfenreaktion; vgl. PASTEUR, Examen critique d'un écrit posthume de CLAUDE BERNHARD sur la fermentation 1879, 90.

2) BEYERINCK, M. W., Üb. Pigmentbildung bei Essigbakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1191, **29**, 169); Üb. *Streptothrix chromogena* (ibid. 1900, **6**, 2).

3) Schwefelwasserstoffbildung in den Stadtgräben und Aufstellung der Gattung *Aërobacter* (Zbl. f. Bakt. II, 1900, **6**, 193).

4) Beitr. z. Ätiol. des Milzbrandes (Zeitschr. f. Hyg. 1889, **7**, 171, 177).

5) MÜLLER, F., Üb. reduz. Eigenschaften v. Bakt. (Zbl. f. Bakt. 1899, **26**, 51); Über Reduktionsvermögen d. Bakt. (ibid. 801).

Eine Methode zur quantitativen Prüfung der reduzierenden Wirkung hat WICHERN beschrieben.[1])

SCHEURLEN und KLETT benutzen selenigsaure Salze.[2]) Dem Rezepte KLETTS folgend, setzt man zu einem Agar- oder Gelatineröhrchen zwei Tropfen einer 2 %igen Lösung von Natrium selenosum: durch die Reduktionstätigkeit der Organismen entsteht rotes metallisches Selen. Zu demselben Zwecke dient auch Natrium tellurosum, das ebenso anzuwenden ist.

W. H. SCHULTZE und KRAMER haben zwei Agarmischungen beschrieben, mit deren Hilfe sich reduzierende und oxydierende Wirkungen von Mikroorganismen nachweisen lassen.[3]) Beim Studium der Reduktionswirkungen bediene man sich einer 1 %igen wässerigen Paranitrosodimethylanilinlösung und einer alkalischen α-Naphthollösung: 1 g Substanz wird mit 100 g Wasser zum Kochen gebracht; sie schmilzt, wenn konzentriertes NaOH tropfenweise zugesetzt wird, und geht dabei zum Teil in Lösung; beim Erkalten fällt von dem Gelösten ein Teil wieder aus; zu der Flüssigkeit wird so lange NaOH tropfenweise zugesetzt, bis sie ein klares, fast ungetrübtes, leicht bräunliches Aussehen zeigt. Paranitrosodimethylanilinlösung und α-Naphthollösung werden zu gleichen Teilen gemischt — die erste ist der zweiten zuzusetzen —, der Niederschlag wird abfiltriert und je ein Teil mit zwei Teilen flüssigen Agars gemischt. Solcher Agar ist vor Gebrauch stets frisch herzustellen, da er an der Luft nachdunkelt. Mikroorganismen, welche reduzierend wirken, färben sich auf dem Agar sofort grün — man prüfe vorher die Brauchbarkeit des Agars durch Auftragen eines Reduktionsmittels (Titantrichlorid).

Zur Herstellung eines Oxydaseagars verwenden SCHULTZE und KRAMER eine 1—2 %ige Lösung von Dimethylparaphenylendiaminchlorhydrat (MERCK) und eine alkalische α-Naphthollösung (s. o.). Zu je 2 Teilen der ersteren kommt ein Teil der zweiten; die erstere ist stets der zweiten zuzusetzen. Die Mischung wird filtriert und ein Teil der Lösung mit 3 Teilen flüssigen Agars vermischt. Man prüft vor Gebrauch durch Auftragen eines Oxydationsmittels (z. B. Ferrizyankali). Oxydierende Mikroben färben den Agar nach kurzer Zeit dunkelblau.

Beide Agarmischungen sind in der hier beschriebenen Form zu länger währender Kultur der Mikroorganismen leider nicht zu verwenden, da sie sich an der Luft auch ohne Mitwirken von Organismen verfärben. —

Einige weit verbreitete Fermente sind außer den reduzierend und oxydierend wirkenden die nachfolgend genannten. — Die wichtigsten sind die

---

1) WICHERN, Quantit. Unters. üb. d. Reduktionswirkung d. Typhus-Coligruppe. (Arch. f. Hyg. 1910, **72**, 1).

2) SCHEURLEN, Die Verwendung der selenigen u. tellurigen Säure in d. Bakt. (Zeitschr. f. Hyg. 1900, **33**, 135); KLETT, Zur Kenntn. d. reduz. Eigensch. der Bakt. (ibid. 137).

3) SCHULTZE, W. H., Üb. eine neue Meth. z. Nachw. v. Reduktions- u. Oxydationswirkungen d. Bakt. (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1911, **56**, 544); KRAMER, G., Beitr. z. sofort. Nachw. v. Oxyd.- u. Reduktionswirkungen d. Bakt. usw. (ibid. I Orig., 1912, **62**, 394).

proteolytischen oder eiweißlösenden, weil ihre Wirkung bei der Herstellung und Beurteilung von Gelatinekulturen von Belang ist: Gelatine wird durch sie verflüssigt. Dabei handelt es sich anscheinend ganz allgemein um tryptische Fermente, d. h. um solche, die das Maximum ihrer Wirkung bei alkalischer Reaktion erreichen.

Gelatineverflüssigende Organismen gibt es unter den Protozoën, Bakterien, Pilzen und Algen.[1]) Namentlich bei der Bestimmung von Bakterien ist eine der wichtigsten Fragen die, ob der fragliche Organismus zu den gelatineverflüssigenden gehört oder nicht. Die Ernährung der Organismen, die Reaktion des Nährsubstrats, die Temperatur und andere Faktoren sind von großem Einfluß auf die Geschwindigkeit des Verflüssigungsprozesses. Beyerinck[2]) zeigte, daß bei sporenbildenden Bakterien (z. B. *Urobacillus*) die Verflüssigung erst nach der Sporenbildung auffällig wird; aus den toten Zellenteilen diffundieren relativ große Mengen von Trypsin heraus, der lebende Plasmabelag hält den größten Teil von diesem zurück. Ähnliches gilt für die Hefen.

Die Verflüssigung der Gelatine durch proteolytische Fermente benutzten verschiedene Autoren[3]) dazu, um an den Veränderungen steriler Gelatinemassen (Zusatz von Karbol, Thymol oder dergl.) den Gehalt irgendwelcher Flüssigkeiten (Nährflüssigkeiten von Pilzen usw.) an tryptischen Fermenten zu messen.

Butkewitsch[4]) stellte fest, daß Gehalt der Nährböden an Pepton die Wirkung proteolytischer Fermente auf Gelatine hemmt.

Verflüssigte Gelatine gibt (durch Verdunstung) mehr Wasser ab als feste; daraus erklärt sich, daß unter den Kolonien verflüssigender Organismen die Oberfläche der Gelatine konkav einsinkt: Kolonien, die unter dem Mikroskop „wie Konkavlinsen wirken, und die dementsprechend bei tiefer Einstellung glänzen und bei hoher dunkel erscheinen", gehören verflüssigenden Organismen an (Günther[5])) und unterscheiden sich somit durch ihr Lichtbrechungsvermögen von den nichtverflüssigenden, welche ein mehr oder minder flaches Polster auf der Gelatineoberfläche darstellen und als Konvexlinse wirken.

---

1) Zahlreiche Literaturangaben bei Fermi und Buscaglioni, Die proteolytischen Enzyme im Pflanzenreich (Zbl. f. Bakt. II, 1899, **5**, 24) und Czapek, Biochemie der Pflanzen, Jena 1905, **2**, 80ff.

2) Beyerinck, M. W., Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien usw. (Zbl. f. Bakt. II, 1901, **7**, 33, 45) sowie: Weitere Beobachtungen über die Octosporushefe (ibid. 1897, **3**, 449, 521).

3) Literatur bei Fermi und Buscaglioni (s. o.); Fermi, Alte und neue Meth. z. Nachw. d. proteol. Enzyme (Zbl. f. Bakt. 1906, **16**, 176; Verwendung der Alkalialbuminate), ferner vgl. ferner Malfitano, La protéolyse chez l'*Aspergillus niger* (Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, **14**, 60) u. a.

4) Umwandl. d. Eiweißstoffe durch d. nied. Pilze usw. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1903, **38**, 147).

5) Einführung in das Studium der Bakteriologie, 6. Aufl., Leipzig 1906, 227.

Der Abbau der Gelatine erfolgt bis zur Albumose (Gelatinose) oder bis zum Pepton; nur im ersten Fall kann das Verflüssigungsprodukt durch Formaldehyd wieder zum Erstarren gebracht werden.

Bei hoher Temperatur ist die Spaltung der Gelatine eine energischere als bei tiefer.[1])

Dieselben Organismen, welche Gelatine verflüssigen, können, wie Eijkman[2]) zeigt, auch Kaseïn spalten. Es handelt sich beidemal offenbar um dasselbe Enzym, dessen Nachweis mit Hilfe des Eijkmanschen Milchagars leicht gelingt. Man sterilisiert getrennt Magermilch und Agar (Bouillonagar oder dergl.) und mischt, nachdem beide etwas abgekühlt sind, im Verhältnis 1 : 3 bis 1 : 6. Erhitzt man beide zusammen, so fällt Kaseïn grobflockig aus; andernfalls entsteht ein brauchbares, gleichmäßig trübes Substrat, das nach Aussaat kaseïnspaltender bzw. gelatineverflüssigender Bakterien an den Kolonien eine Aufhellungszone bekommt. Trägt man auf dem Agar einen Streifen (gefärbte) Gelatine auf, so kann man sich davon überzeugen, daß in gleichem Schritt mit der Kaseïnspaltung auch die Gelatineverflüssigung fortschreitet; die flüssige Gelatine wird vom Agar resorbiert.

Einen Mikroorganismus, der selbst koaguliertes Eiweiß zu lösen vermag, beschrieb Maassen.[3])

Wird Milch durch Mikroorganismen zum Gerinnen gebracht, so beruht diese Veränderung auf der durch entstandene Säure veranlaßten Kaseïnfällung („Quarg“) oder auf der ohne Säuerung eintretenden, durch ein Ferment (Lab) bedingten Fällung („Bruch“). Labbildende Pilze und Bakterien sind weit verbreitet; alle peptonisierenden Mikroorganismen dürften auch Labbildner sein. Eine Methode, proteolytische und kaseïnfällende Wirkung nebeneinander zu beobachten, hat Eijkman beschrieben: auf Milch- oder Kaseïnagar entsteht eine aufgehellte Zone rings um die Organismen, welche das Kaseïn lösen: rings um diese Zone bildet sich bei laberzeugenden Mikroben eine dunklere, in der Kaseïnfällung eingetreten ist.[4])

---

1) Über verflüssigte Gelatine, die bei 10° wieder erstarrt, vgl. Conti, Sulla possibilità di far crescere in infissione solida alcune specie di batteri liquefac. (Riv. d'ig. e san. pubbl. 1891, Nr. 18). Über die Wirkung von Formalin auf verflüssigte Gelatine vgl. Tiraboschi. Osserv. relative alla fluidificaz. d. gelatina usw. (vgl. Ref. in Zbl. f. Bakt. I, 1906, **38**, 486). Ferner: Mavrojannis, A., Formol als Mittel zur Erforschung der Gelatineverflüss. durch d. Mikroben (Zeitschr. f. Hyg. 1903, **45**, 108). Bogoluboff, W. L., Quelques faits au sujet de l'action de la formaline sur la gélatine liquéfiée par des staphylocoques (Rousski Wratch 1907, 259; vgl. Bull. Inst. Pasteur, 1907, **5**, 429). Zur Chemie der verflüssigten Gelatine vgl. Mesernitzky, P., Üb. d. Zersetzung der Gelatine durch *Microc. prodig* (Biochem. Ztschr. 1910, **29**, 104).

2) Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen (Zbl. f. Bakt. 1901, **29**, 841). Weitere Literatur zitiert bei Eijkman, Milchagar als Medium z. Demonstration d. Erzeugung proteol. Ferm. (ibid. II, 1903, **10**, 53).

3) Fruchtätherbildende Bakterien (Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt 1899, **15**, 500).

4) Eijkman 1901 a. a. O. — Über Einteilung der Mikroben nach ihrem Verhalten der Milch gegenüber vgl. Biffi, U., La coagulabilità al calore delle culture in latte come elemento di diagnosi bacteriologica (Soc. med. chir. Bologna 1906; auch 1907).

Für den Nachweis diastatischer Fermente benutzte WENT[1]) bei Untersuchung eines Pilzes (*Monilia sitophila*) einen mit Stärkekleister angerührten Agar: in der Nähe des Pilzes wird die Agarplatte etwas aufgehellt; nach Zusatz von Jodjodkalium werden die vom diastatischen Ferment betroffenen Stellen rotbraun, die andern blau. Nach EIJKMAN (a. a. O. p. 846) erfährt der Nährboden an denselben Stellen eine schwache Einsenkung. Stärkelösende Bakterien sind offenbar weit verbreitet (VAN SENUS[2]), EIJKMAN). — „Stärkegallert" (s. o.) wird durch manche Mikroorganismen verflüssigt.

Diastatische sowie invertierende Fermente weist BEYERINCK[3]) mit Hilfe der Leuchtbakterien nach. Gibt man zu Kulturen, die nicht mehr leuchten, Stärke und Rohrzucker, so tritt zunächst noch keine Reaktion ein; überträgt man gleichzeitig mit den Substanzen einen Organismus, welcher diastatische oder invertierende Enzyme liefert, so beginnt die Kultur unter dem Einfluß der gebildeten Zuckerarten (Maltose, Glukose) sofort wieder zu leuchten.

Sehr gering scheint die Zahl der Organismen zu sein, welche Agar verflüssigen können. Wir werden sie bei Besprechung der Algen und Bakterien kennen lernen; bei letzteren wird auch der Serumverflüssiger zu gedenken sein.

Bei der Gelegenheit sei der milchweißen Trübung des Agars Erwähnung getan, die bei Kultur einiger pathogener Bakterien[4]) beobachtet worden ist: offenbar handelt es sich bei dieser Erscheinung um eine durch Säureproduktion hervorgerufene Eiweißfällung.

Verflüssigung von Mannan beobachtete SAWAMURA[5]).

Zelluloselösende Enzyme sind zweifellos bei Bakterien und Pilzen sehr verbreitet. Dafür spricht nicht nur die Zellulosezerstörung toter Pflanzenteile im Boden, sondern auch die Wirkung der auf Pflanzen vegetierenden Parasiten. ITERSON[6]) weist die Produktion zelluloselösender Enzyme durch Kultur auf Filtrierpapier nach, dessen Fasern allmählich von den Organismen zerstört werden. — Mit Hilfe der Diffusionsmethode (EIJKMAN) läßt sich diese Gruppe der Enzyme bisher nicht nachweisen.

Hämolytische Enzyme weist EIJKMAN mit Hilfe des Blutagars nach (a. a. O. p. 845). Gewöhnlicher, auf 55° C abgekühlter Agar wird mit einzelnen sterilen Bluttröpfchen gut gemischt. Auf den damit gegossenen trüben Plat-

---

1) Sitzber. Kgl. Akad. Wiss. Amsterdam 1901.

2) Habilitationsschrift. Leiden 1890.

3) Die Bakt. d. Papilionazeenknöllchen (Botan. Ztg. 1888, **46**, 725).

4) LIBMANN, Über einen neuen pathogenen *Streptococcus* (Zbl. f. Bakt. 1900, **28**, 293).

5) On the liquefaction of mannan by microbes (Bull. Coll. Agric. Tokyo 1903, **5**, 259; Zbl. f. Bakt. II, 1904, **11**, 21).

6) Die Zersetzung d. Zellulose durch aërobe Mikroorganismen (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **11**, 689). Vgl. auch GRÜSS, Biol. Erschein. bei d. Kultivierung v. *Ustilago Maydis* (Ber. d. D. Bot. Ges. 1902, **20**, 212).

ten rufen Bakterien, welche hämolytische Enzyme ausscheiden, lokale Aufhellung hervor. Hämolyse, sowie Entfärbung des Blutfarbstoffes (Hämoglobinolyse) durch Mikroorganismen demonstriert LODE[1]) auf Blutagar nach EIJKMANs Diffusionsmethode.

Lipasen werden in der Weise nachgewiesen, daß man mit EIJKMAN (a. a. O. p. 847) auf den Boden einer Petrischale eine dünne Schicht Fett, z. B. Rindertalg, ausbreitet und darüber nicht zu heißen Agar ausgießt, ohne daß das Fett schmilzt. Unter den Kolonien verschiedenartiger Mikroorganismen tritt eine auffällige Veränderung des Fettes ein: es wird undurchsichtiger, brüchig und feucht und bleibt, wenn man die Agarschicht aus der Schale löst, an jener haften. EIJKMAN zeigte, daß es sich bei dieser Verseifung des Fettes um die Wirkung fettspaltender Fermente handelt.

Schließlich lassen sich noch elastinspaltende Fermente durch die Diffusionsmethode nachweisen. EIJKMAN[2]) digeriert feingeschnittene Kalbslunge, Nackband oder Arterienwände tagelang bei 37° abwechselnd mit verdünnter Kalilauge und verdünnter Essigsäure. Das erhaltene Elastinpulver wird als wässerige Suspension diskontinuierlich bei 80—90° C sterilisiert; nach Absetzen der gröberen Teilchen gewinnt man eine gleichmäßig trübe Flüssigkeit, die zu einem Elastinagar sich verarbeiten läßt. *Bacillus pyocyaneus* und einige andere Mikroben geben auf solchem Nährboden einen deutlichen Aufhellungshof.

Katalase, d. h. das Ferment, welches H_2O_2 zerlegt und aus ihm Sauerstoff frei werden läßt, entsteht in den Kulturflüssigkeiten, auf welchen Mikroorganismen wachsen, oft in erstaunlicher Menge; man überzeugt sich von seiner Gegenwart, indem man zu der gebrauchten Nährlösung H_2O_2 (z. B. MERCKs Perhydrol) träuf lt.[3]) Organismen der verschiedensten Art lassen Katalase entstehen. —

Bei der letzten Gruppe von Stoffwechselprodukten, die wir noch zu nennen haben, handelt es sich um Stoffe, über deren chemische Natur bisher so gut wie nichts bekannt ist, und von welchen wir nur wissen, daß sie entwicklungfördernd und entwicklunghemmend auf die betreffenden Lebewesen einwirken. Die Erforschung dieser Verbindungen, die für viele ernährungsphysiologische Fragen von größter Bedeutung zu werden verspricht, steckt zurzeit noch in den ersten Anfängen, und ihre Wiederaufnahme ist dringend erwünscht.[4]) NIKITINSKY[5]) machte die überraschende Entdeckung, daß bei Kultur von *Aspergillus* in der Nährlösung Stoffe entstehen, welche

1) Exper. Unters. üb. Bakterienantagonismus I (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1903, **33**, 196).
2) Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1904, **35**, 1).
3) Über den quantitativen Nachweis der Katalase vgl. z. B. JORNS, A., Üb. Bakterienkat. (Arch. f. Hyg. 1908, **67**, 134).
4) Vgl. KÜSTER, E., Üb. chem. Beeinflussung der Organismen durcheinander. Leipzig 1909.
5) Über die Beeinflussung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprod. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1904, **40**, 1).

diese für das Wachstum des Pilzes nur günstiger machen. Ähnliche Beobachtungen machte Rahn[1]) an Bakterienkulturen: neben wachstumhemmenden, die sich durch Kochen zerstören lassen, entstehen auch wachstumfördernde, die durch Kochen nicht verändert werden.

Wachstumhemmende thermolabile Stoffwechselprodukte sind ferner in den Nährlösungen verschiedener Schimmelpilze nachgewiesen worden[2]): gebrauchte Nährlösungen sind für die Keimung frischer Aussaaten wenig geeignet; durch Kochen werden solche Lösungen verbessert.

Die wachstumhemmende Wirkung gebrauchter Nährlösungen macht sich nicht nur derjenigen Spezies gegenüber bemerkbar, welche die Stoffwechselprodukte geliefert hat, sondern auch bei Kultur anderer Arten auf gebrauchten Nährsubstraten. Um die Einwirkung verschiedener Arten aufeinander zu studieren, sät man sie nebeneinander auf Petriplatten aus und beobachtet das Verhalten der Organismen an den Seiten, welche sie einander zuwenden. Die Mannigfaltigkeit der Wirkungsweisen ist zumal bei Pilzen eine sehr große.

Sehr wertvoll bei der Untersuchung der von Mikroorganismen jeder Art ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte sind die Kollodiumsäckchen, die man leicht herstellen und als Kulturbehälter verwenden kann. Reagensgläser werden inwendig mit Kollodiumlösung ausgegossen; Kellerman löst hierfür 10 g Schießbaumwolle in 150 ccm Eisessig und 50 ccm absolutem Alkohol. Man dreht das Reagensglas, damit seine Innenwand gleichmäßig benetzt wird, gießt die überschüssige Flüssigkeit ab und läßt den haftengebliebenen Inhalt — die Öffnung der Eprouvette bleibt nach unten gewandt — einige Minuten bis eine Stunde trocknen; je länger das Kollodiumhäutchen trocknet, um so geringer ist später seine Permeabilität. Die Dauer des Trocknens ist also den Zwecken, zu welchen man die Kollodiumhäutchen verwenden will, anzupassen. Ist der Film trocken, so gießt man Wasser in das Reagensglas und holt ihn vorsichtig heraus.[3]) Auch enzymatische Bestandteile gebrauchter Nährlösungen vermögen durch die Kollodiumhäute zu permeïeren.

Bei Kultur in Kollodiumhäutchen und überhaupt in Membranen irgendwelcher Art wird man sich freilich stets erst vergewissern müssen, ob die gerade vorliegende Art der kultivierten Mikroorganismen nicht selbst intakte Häutchen zu durchdringen vermag.[4])

---

1) Über d. Einfl. d. Stoffwechselprod. auf d. Wachst. d. Bakt. (Zbl. f. Bakt, 2. Abt., 1906, **16**, 417).

2) Küster, E., Keimung u. Entwickl. v. Schimmelpilzen in gebrauchten Nährlösungen (Ber. d. D. bot. Ges. 1908, **26**a, 246; s. auch Lutz, Dissertation Halle 1909).

3) Vgl. z. B. Kellerman, K. F., An improved method for making collodion tubes for dialysing (Journ. appl. micr. 1902, **5**, 2038); The permeability of collodion tubes (Zbl. f. Bakt. II, 1912, **34**, 56; dort Literaturangaben).

4) Nach Heymans (Sur la perméab. des filtres, des ultrafiltres et des membr. dialys. aux microbes; ultra-diapédèse microbienne, Bull. acad. méd. Belgique, sér. IV, **26**, 1912) sollen die Bakterien durch eine Art Diapedese die Häutchen passieren können.

Es ist nicht schwer, den Nachweis dafür zu erbringen, daß unter dem Einfluß der von benachbarten Mikroorganismen gelieferten Stoffwechselprodukte nicht nur formative Prozesse sich anders abspielen als an unbeeinflußten Individuen, sondern daß auch die chemischen Leistungen der Organismen unter der gegenseitigen chemischen Beeinflussung andere werden. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, die zur Untersuchung vorliegenden Organismen nicht nur in Reinkulturen, sondern auch in Mischkulturen, d. h. in der Gesellschaft einer oder mehrerer anderer, willkürlich gewählter Arten zu kultivieren („*cultures pures mixtes*"). Je ähnlicher wir hinsichtlich der Mischung verschiedener Mikrobenarten unsere Kulturen den in der freien Natur tätigen Mikrobengesellschaften machen, um so besser werden wir das Verhalten der Mikroben an ihren natürlichen Standorten, an welchen sie in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle unter dem Einfluß der von zahlreichen anderen Arten gelieferten Stoffwechselprodukte stehen, beurteilen lernen. So hoch der Wert der Reinkultur für die Erforschung einer Mikrobenspezies auch zu veranschlagen ist, so wird diese doch in sehr vielen Fällen eine Ergänzung durch das Mischkulturverfahren erfordern.[1])

Die Schwierigkeiten, die solchen Forschungen im Wege stehen, sind nicht geringe; es steht aber zu erwarten, daß gerade durch sie Resultate gewonnen werden können, die auch für die angewandte Biologie der Mikroorganismen von größtem Wert sind. —

Zum Schluß sei noch darauf hingewiesen, daß unter dem Einfluß der Mikroorganismen der osmotische Druck der Nährlösungen steigt[2]); die Erscheinung dürfte wenigstens dann, wenn in der Nährlösung organische Verbindungen von hohem Molekulargewicht vorliegen, allgemein eintreten.

Mit den Veränderungen, welche die Nährlösungen während der Entwicklung der Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit erfahren, ist dem Forscher ein bequemes Mittel an die Hand gegeben, sich von dem Eintreten bestimmter Veränderungen im Nährmedium zu überzeugen; welcher Art diese Veränderungen sind, läßt sich freilich aus dem Ergebnis der Leitfähigkeitsprüfung nicht erschließen.[3])

10. Giftwirkungen.

Von Giftwirkungen sprechen wir, wenn irgendwelche Stoffe durch ihre chemischen Qualitäten die Entwicklung der Organismen hemmen oder diese

1) Beiträge zu dieser Frage z. B. bei CANTANI: Über d. Verwertung v. Bakt. als Nährbodenzusatz (ibid. 1900, **28**, 743), ferner NENCKI, Über Mischkulturen (Zbl. f. Bakt. 1892, **11**, 225). Weitere Angaben im Speziellen Teil (Pilze, Bakterien).

2) Einige Angaben bei CHABRIÉ, Consid. d'ordre chim. s. l'action des ferments solubles etc. (C. R. Soc. biol. 1898, 105); USCHINSKI, Üb. d. Veränd. einiger phys.-chem. Eigensch. d. Nährmedien etc. (Zbl. f. Bakt. I, 1903, **33**, 88).

3) Vgl. OKER-BLOM, M., Die elektr. Leitfähigkeit im Dienste der Bakteriol. (Zbl. f. Bakt. I Orig. 1912, **65**, 382; dort auch ein verbessertes Widerstandsgefäß beschrieben.)

töten, und ferner auch, wenn Stoffe, welche für Wachstum und Fortpflanzung eines Organismus entbehrlich sind, diesen in seiner Entwicklung fördern; Wirkungen der zweiten Art gehen nur von sehr verdünnten Lösungen bestimmter Stoffe aus. Unsere Kenntnis von den Wirkungen der „Gifte“ auf die Organismen ist nicht zum geringsten Teil durch Experimente an künstlich kultivierten Mikroorganismen gewonnen worden.

Als Gifte kommen vor allem drei Gruppen von Verbindungen in Betracht: die Schwermetallsalze, die Säuren und die Laugen. Alle Giftwirkungen setzen in erster Linie eine bestimmte chemische Eigenart des betreffenden Stoffes voraus; eine Reaktion des Organismus, die den Charakter einer Giftwirkung trägt, hat aber des weiteren einen geeigneten Lösungszustand des Giftstoffes und einen bestimmten Zustand der Plasmahaut und des lebendigen Zelleninhaltes überhaupt zur Voraussetzung.

Was den Lösungszustand der Giftstoffe betrifft, so ist zunächst daran zu erinnern, daß nach der Dissoziationstheorie die Moleküle der Elektrolyte beim Lösen in Ionen zerfallen, derart, daß in einer Lösung unveränderte Moleküle neben Ionen vorliegen, und zwar um so mehr von letzteren, je verdünnter die Lösung ist. Es hat sich nun gezeigt, daß unzerlegte Molekel und Ionen ganz verschieden auf lebendige Zellen wirken, und daß insbesondere die Giftwirkungen im allgemeinen in erster Linie Ionenwirkungen sind. Ausführliche Untersuchungen sind z. B. mit Sublimat ($HgCl_2$) angestellt worden: den Untersuchungen von PAUL und KRÖNIG[1]) verdanken wir die Erkenntnis, daß die Giftwirkung von Quecksilbersalzlösungen sich nicht nach ihrem Gesamtquecksilbergehalt, sondern nach ihrem Gehalt an Hg-Ionen richtet: stark dissoziierte Hg-Verbindungen sind demnach stärkere Gifte als schwach dissoziierte, ferner erklärt sich hieraus, daß durch Zusatz von Chloriden zu $HgCl_2$, deren Cl-Ionen die Dissoziation des Sublimats zurückhalten und somit nur verhältnismäßig wenig Hg-Ionen aus den Sublimatmolekeln frei werden lassen, die Giftigkeit der Sublimatlösungen vermindert wird.[2]) — Säuren und Laugen wirken ebenfalls um so giftiger, je stärker ihre Dissoziation ist, — jene wirken durch die H-Ionen, diese durch die OH-Ionen. Übrigens sind bereits Verbindungen bekannt, die als Molekel stärkere Giftwirkung ausüben als in Ionenform.

Das Gesagte bezieht sich auf die zellentötende und entwicklungshemmende Wirkung der Gifte, die entwicklungsfördernde ist besonders für Schwermetallsalze festgestellt worden: sehr verdünnte Lösungen von Kupfer- oder Zinksulfat regen Pilze zu besonders üppigem Wachstum an, während konzentriertere Lösungen hemmend oder tötend wirken. Man hat die an-

---

1) Üb. d. Verhalten d. Bakt. zu chem. Reagentien (Zeitschr. f. physik. Chemie 1896, **21**, 414); Die chem. Grundlagen d. Lehre v. d. Giftwirkung u. Desinfektion (Zeitschr. f. Hyg. 1897, **25**, 1).

2) Hierüber sowie überhaupt über alle einschlägigen Fragen gibt besonders HÖBER, R., Physik. Chemie d. Zelle u. d. Gewebe (3. Aufl., Leipzig 1911) Aufschluß.

regende Wirkung den Ionen, die entwicklungshemmende den unzerlegten Molekülen zugeschrieben.[1])

11. Mikrobiochemische Analyse, Auxanogramm.

Daß unter Umständen schon äußerst geringe Mengen irgendeines im Nährboden enthaltenen Stoffes genügen, um einem Organismus Wachstum und Vermehrung zu gestatten, ihn zu Wachstumsleistungen und Stoffwechselvorgängen besonderer Art anzuregen oder auch ihn zu vergiften, wurde schon wiederholt hervorgehoben. Hierauf beruht die von Beyerinck verschiedenen Zwecken angepaßte Methode der „mikrobiochemischen Analyse".[2])

Der Sauerstoffnachweis mit Hilfe sauerstoffempfindlicher beweglicher Bakterien und insbesondere mit Hilfe der Leuchtbakterien ist für den Pflanzenphysiologen besonders wertvoll; nächst diesem Nachweis ist das bekannteste „mikrobiochemische" Verfahren der Arsennachweis durch *Penicillium brevicaule.*

Gosio wies nach, daß dieses bei Gegenwart von As-Verbindungen einen auffälligen Knoblauchgeruch (nach Diäthylarsin) entwickelt.[3]) Maassen konnte nachweisen, daß auch bei Gegenwart von Tellurverbindungen ähnlich riechende Gase entstehen, während die Gegenwart von Selenverbindungen sich durch einen merkaptanähnlichen Geruch kundgibt.

Sehr viel schwieriger ist es, mit Beyerinck z. B. den Gehalt eines Trinkwassers an organischer Substanz dadurch nachzuweisen, daß man in ein bestimmtes Quantum der sterilen Flüssigkeit minimale Mengen Bakterien aussät und nach gegebener Zeit durch die übliche Zählung die Entwicklung, die das Aussaatmaterial gefunden hat, zu bestimmen sucht. Die von Beyerinck selbst anerkannten „Hauptschwierigkeiten" des Verfahrens sind nicht gering. —

Die von demselben Verfasser beschriebene auxanographische Methode ist leicht zu handhaben[4]) und schon den verschiedensten Zwecken dienstbar gemacht worden. Ein „Auxanogramm" erhält man, wenn man durch Zusatz bestimmter Stoffe auf einem plattenförmigen Kulturboden die Entwicklung des Organismus fördert bzw. hemmt und dadurch die Abhängigkeit der Organismen von bestimmten Stoffen gleichsam zur graphischen Darstellung bringt.

---

1) Richter, A., Zur Frage der chemischen Reizmittel (Zbl. f. Bakt., II, 1901, **7**, 417).

2) Qualitative und quantitative mikrobiochemische Analyse (Zbl. f. Bakt. 1891, **10**, 723).

3) Literatur bei Abba, Über die Feinheit der biolog. Methode beim Nachweis des Arseniks (Zbl. f. Bakt., II 1898, **4**, 806); Abel u. Buttenberg, Einwirkung von Schimmelpilzen auf Arsen usw. (Zeitschr. f. Hyg. 1899, **32**, 449); Maassen, Die biolog. Methode Gosios z. Nachw. d. Arsens usw. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1902, **18**, 475).

4) L'auxanographie ou la méthode de l'hydrodiffusion dans la gelatine appliquée aux rech. microbiol. (Arch. Néerland. **23**, 367).

Sät man z. B. Weinhefe auf kaliumphosphathaltiger Gelatine aus und trägt Tropfen von Asparagin- und Glukoselösung auf, so daß sich die Diffusionsfelder überschneiden, so erhält man diesen entsprechende linsenförmige Auxanogramme. Ringförmige entstehen, wenn nur am Rande eines Diffusionsfeldes die für den betreffenden Mikroorganismus vorteilhafte Konzentration vorliegt. Durch Auftragen von antiseptisch wirkenden Stoffen, von Metallen usw. kann man die Entwicklung der Organismen hemmen; es resultieren steril bleibende Stellen in der Gelatineplatte oder Wachstumsfelder, die an der dem Gifte zugewandten Seite runde Ausschnitte zeigen.[1]) — Phosphoreszierende Auxanogramme wurden von BEYERINCK u. a. hergestellt.

Die mikrobiochemischen Methoden dürften sich noch für manche neue Zwecke anpassen und auch den Aufgaben der angewandten Biologie dienstbar machen lassen.

12. Konservierung von Kulturen.

Die Konservierung von Kulturen muß verschieden gehandhabt werden je nach Art des Nährbodens und der auf ihm gezüchteten Organismen. Für viele Organismen gibt es wohl noch keine Konservierungsverfahren, welche das charakteristische Aussehen der Kulturen für Demonstrationszwecke usw. festhielten. Für derbe Pilze genügt es unter Umständen, sie samt ihrer Gelatineunterlage im Trockenschrank eintrocknen zu lassen, zartere Objekte auf Gelatine behandelt man mit Formalin. Gelatineplatten und Rollkulturen mit Bakterien übergießt man mit Sublimat (1—0,1 %) und läßt sie nach Abgießen der Lösung eintrocknen. SCHILL[2]) nimmt eine Mischung aus gleichen Teilen Alkohol und Glyzerin mit Sublimatzusatz; nach 1—2 Tagen wird die Flüssigkeit wieder abgegossen. HASTINGS[3]) übergießt die Kulturen mit einer dünnen Schicht klaren Glyzerinagars.

Auf die Details dieser Spezialtechnik kann hier nicht eingegangen werden. Ich begnüge mich mit dem Hinweis auf einige einschlägige Abhandlungen.[4])

B. Spezieller Teil.

Als Mikroorganismen werden herkömmlicherweise diejenigen einfachsten Lebewesen bezeichnet, die erst unter dem Mikroskop für das menschliche Auge wahrnehmbar werden, vor allem die einzelligen Vertreter des Tier- und Pflanzenreichs. Einzellig sind unter den Tieren die Protozoën, unter den Pflanzen die meisten Bakterien, die Flagellaten, viele Algen und Pilze und

---

1) Von weiterer Literatur z. B. BEHRING, Über Desinfektion, Desinfektionsmittel u. Desinfektionsmethoden (Zeitschr. f. Hyg. 1890, **9**, 395).

2) Kleine Beiträge zur bakteriologischen Technik (Zbl. f. Bakt., 1889, **5**, 337).

3) HASTINGS, E. G., A method for the preservation of plate cult. for museum and demonstr. purposes. (Zbl. f. Bakt. II, 1912, **34**, 432.)

4) SOYKA u. KRÁL, Vorschläge u. Anleitungen zur Anlegung von bakteriologischen Museen (Zeitschr. f. Hyg., 1888, **4**, 143). KRÁL, Weitere Vorschl. u. Anleit. z. Anleg. von bakteriolog. Mus. (ibid. 1889, **5**, 497); PAUL, TH., Ein Verfahren, Dauerpräparate von Bakterienkulturen herzustellen usw. (Zbl. f. Bakt., I 1901, **29**, 25). Weitere Literatur zusammengestellt bei FRIEDBERGER in Handb. d. pathog. Mikroorganismen, 1903, **1**, 475.

die Myxomyzeten, wenigstens in den ersten Stadien ihrer Entwicklung. Wir werden es also bei unseren Betrachtungen mit Vertretern der verschiedensten Verwandtschaftskreise der Organismenwelt zu tun haben; denn beim Studium sämtlicher genannter Organismengruppen spielt die Möglichkeit, ihre Vertreter in künstlichen Kulturen zu züchten und zu beobachten, eine große Rolle. Die Methoden der künstlichen Züchtung sind aber nicht nur bei den einzelligen Vertretern der genannten Gruppen, sondern mit gleichem Erfolge auch bei ihren vielzelligen Verwandten anwendbar, so daß es eine gewaltsame Beschränkung unseres Stoffes bedeuten würde, wenn wir bei den nachfolgenden Erörterungen uns durchaus mit der Behandlung der Einzeller begnügen wollten.

Aufgabe des „Speziellen Teiles" wird es sein, die genannten Gruppen tierischer und pflanzlicher Lebewesen der Reihe nach zu besprechen und dabei das für sie im allgemeinen Gültige und das für einzelne Unterabteilungen oder Gattungen Ermittelte anzuführen.

Die Protozoën (ausschließlich der Flagellaten) sind bisher nicht in Reinkulturen gezüchtet worden; sie bedürfen der Ernährung durch gleichzeitig mit ihnen kultivierte Bakterien.

Die Flagellaten verhalten sich hinsichtlich ihrer Kultivierbarkeit sehr verschieden: manche kommen hinsichtlich ihrer Ernährungsansprüche den Algen oder Bakterien, andere den Protozoën gleich.

Die Myzetozoën (oder Myxomyzeten) müssen wie die Protozoën mit Bakterien ernährt werden.

Alle folgenden Gruppen lassen sich in Reinkulturen halten:

die Algen — auf organischen wie anorganischen Nährböden,
die Pilze — durchweg auf organischen,
die Bakterien — fast ausschließlich auf organischen Nährböden.

Bei jeder Gruppe wollen wir einige Worte über Vorkommen und Fundorte der betreffenden Organismen sagen und allgemeine Bemerkungen über ihre Ernährungsphysiologie, über Methoden ihrer Kultur, über Reaktion und Konzentration der Nährböden, über besondere Stoffwechselprodukte usw. geben — und hiernach einige morphologisch oder biologisch gut gekennzeichnete Untergruppen oder einzelne Gattungen kurz behandeln. —

Im „Anhang" soll gezeigt werden, daß die durch die Mikrobiologie und die Kultur der Mikroorganismen gewonnenen Erfahrungen auch bei Forschungen auf anderen Gebieten der Naturwissenschaften sich verwerten lassen werden.

1. Protozoën.

Läßt man Aufgüsse von Erde, Heu, Stroh, trockenem Laub u. dgl. bei Zimmertemperatur oder bei 20—25° stehen, so vermehren sich die am Material haftenden Amöben und Ziliaten schon innerhalb der ersten 24 Stunden sehr reichlich. Sie werden als Material für die ersten Versuche genügen.

Ernährung, künstliche Kulturen. — Für die künstliche Kultur der Protozoën von allergrößter Wichtigkeit ist, daß sie sich, soweit die bisherigen Forschungen ermitteln konnten, nicht auf osmotischem Wege zu ernähren vermögen. Bei Kultur auf künstlichen Substraten kommen diese für die Protozoën nicht direkt als „Nähr"böden in Betracht, sondern nur als Unterlage und Aufenthaltsort; die Ernährung der Organismen geschieht durch Aufnahme fester Teilchen, insbesondere durch Verschlingen von lebenden Bakterien.[1]) Solche müssen also als Futtermaterial den Protozoën verabfolgt und gleichzeitig mit ihnen kultiviert werden. Reinkulturen sind bisher noch niemals gelungen. Unser Bemühen muß vorläufig darauf gerichtet bleiben, Bakterienarten zu finden, die für bestimmte Protozoën als geeignetes Futtermaterial sich empfehlen, bei den gleichzeitig mit den Protozoën ausgesäten Bakterien wenigstens von Reinkulturen auszugehen und ein Prävalieren der Bakterien über die Protozoën zu verhindern. Es scheinen zwar im allgemeinen bestimmte Protozoën keineswegs an bestimmte Bakterienarten gebunden zu sein, doch können ohne Zweifel manche von diesen durch störende Stoffwechselprodukte für die Protozoënkultur ungeeignet werden. Wülker hält ein Stäbchen der *fluorescens*-Gruppe und mehrere Stämme des *Bact. coli* für besonders geeignet.[2])

Da sich Protozoën nicht in Reinkulturen halten lassen, sind wir auch über ihre Ernährungsphysiologie im einzelnen noch keineswegs unterrichtet: wir können z. B. nicht entscheiden, ob die in den Kulturböden enthaltenen unentbehrlichen Stoffe unmittelbar für die Ernährung der Protozoën notwendig sind oder nur für die der Bakterien. Gewiß werden sich manche schätzenswerte Aufschlüsse dadurch gewinnen lassen, daß wir mit Beyerinck (a. a. O.) bestimmte Protozoën mit verschiedenen ernährungsphysiologisch wohlerforschten Bakterien kombinieren und die Resultate unserer Kulturen vergleichen. — In Mischkulturen ist es ferner naturgemäß noch schwerer als in Reinkulturen, die Bedingungen einigermaßen konstant zu halten und die störenden Einflüsse, die von Stoffwechselprodukten ausgehen, zu kontrollieren.

Die Reinkultur der Protozoën prinzipiell für ausgeschlossen zu halten, scheint mir keine Nötigung vorzuliegen. Vielleicht gelingt sie mit gewissen parasitisch lebenden Amöben und Ziliaten, um deren Kultur freilich schon mehrere Forscher sich vorläufig vergeblich bemüht haben.[3]) Daß es Protozoën gibt, welche auch ohne Aufnahme fester Partikel auskommen, hat Gru-

---

1) Über die Ernährung von Amöben mit Hefen vgl. z. B. Beyerinck, Kulturversuche mit Amöben auf festem Substrat (Zbl. f. Bakt. I 1896, **19**, 257, 1898, **21**, 101).

2) Wülker, G., Die Technik der Amöbenzüchtung (Zbl. f. Bakt. I, Ref., 1911, **50**, 577); dort zahlreiche weitere Literaturangaben.

3) Nur mit Reserve möchte ich hier die Resultate der Autoren nennen, welche eine bakterienfreie Protozoënkultur bereits erreicht zu haben glauben; zuletzt hat wohl Anna W. Williams (Pure cult. of amebae parasitic in Mammals, Journ. med. res. 1912, **25**, 263) über positive Resultate berichtet (*Amoeba coli, A. intestinalis* u. a.).

BER[1]) durch seine Versuche mit algenführenden Organismen erwiesen, und überdies ist nicht anzunehmen, daß bakterienfressende Protozoën von den sie umspülenden wassergelösten Nährstoffen völlig unbeeinflußt bleiben sollen, da sie gewissen Giften (wie manchen Bakterienstoffwechselprodukten) gegenüber sich als so empfindlich erweisen. Fütterungen mit Stärke, festem Eiweiß u. a. stellte MEISSNER[2]) an. Das letzte Wort in dieser Angelegenheit ist vielleicht doch noch nicht gesprochen.

Die Aufschlüsse, die wir uns von Reinkulturen für die Protozoënforschung versprechen dürfen, sind von allergrößter Bedeutung. WOODRUF gelang es, seine Paramaecien (*P. aurelia*) binnen 3½ Jahren mehr als 2000 Teilungen machen zu lassen, ohne daß es zur Kopulation gekommen wäre.[3]) Die Verbesserung der Kulturmethoden, welche diese Resultate ermöglichte, läßt uns über die physiologische Bedeutung der Sexualität der Paramaecien ein ganz anderes Urteil gewinnen als z. B. die viel diskutierten Ergebnisse MAUPAS'.[4]) Auch kann ich mich nicht dazu entschließen, die „Depressionszustände", die in Protozoënkulturen zeitweilig sich bemerkbar machen, für „physiologisch" zu halten (R. HERTWIG); vielmehr handelt es sich bei ihnen offenbar um die Folgen irgendwelcher schwer kontrollierbarer Veränderungen in der Kulturflüssigkeit, die sich freilich nicht immer leicht werden ausschließen lassen, solange die Kulturen neben den Protozoën noch die verschiedensten Lebewesen anderer Art beherbergen.

Die Protozoën von den gleichzeitig mit ihnen kultivierten Lebewesen auf chemischem oder mechanischem Wege zu trennen, ist schon verschiedenen Forschern gelungen. Neuerdings gaben MUSGRAVE und CLEGG[5]) eine Reihe von Methoden zur Isolierung (nicht aber zur Reinzüchtung!) von Amöben an; am einfachsten ist es, in enzystierten Kulturen die Bakterien durch Hitze oder chemische Mittel wie Formaldehyd zu vernichten: die widerstandsfähigen Amöbenzysten bleiben am Leben.

Reaktion und Konzentration der Nährböden. — BEYERINCK züchtet Amöben auf neutralem oder schwach alkalischem Nährboden, desgleichen VAHLKAMPF[6]), der aber zuweilen auch mit sauren Böden gute Erfolge erzielte.

---

1) Üb. grüne Amöben (Ber. Naturf. Ges. Freiburg i. Br. 1899, **11**, 59)

2) Beitr. zur Ernährungsphysiologie der Protozoën (Zeitschr. für wiss. Zool., 1888, **46**, 498). TSUJITANI (Über die Reinkultur der Amöben, Zbl. f. Bakt. 1898, **24**, 666) will auch mit toten (abgekochten) Bakterien positive Kulturresultate erzielt haben.

3) WOODRUF, L. L., Two thousand generations of *Paramaecium* (Arch. f. Protistenkunde 1911, **21**, 263); vgl. auch STATKEWITSCH, Zur Methodik d. biolog. Unters. über die Protisten (ibid. 1904, **5**, 17).

4) Vgl. z. B. Rech. expér. sur la multipl. des Infusoires ciliés (Arch. zool. exp. Ser. II, 1888, **4**.)

5) The cultivation and pathogenesis of Amoebae (Philipp. Journ. of Sc. 1906, **1**, 909).

6) Beitr. z. Biol. u. Entwicklungsgeschichte von *Amoeba limax*, einschließlich der Züchtung auf künstlichen Nährböden (Arch. f. Protistenkde. 1905, **5**, 167).

Über den Einfluß von Alkalizusatz finden sich verschiedene Angaben in der Literatur; beachtenswert scheint LÖBS Beobachtung[1]), daß sehr schwacher Zusatz von NaOH (gegen $^1/_{1200}$ %) die Lebensdauer der Protozoën zu verlängern und diese gegen die Wirkung von Zyankali und anderer Gifte zu schützen vermag.

An steigende Konzentrationen von Chlornatrium, Kaliumnitrat u. a. passen sich Protozoën im allgemeinen leicht an[2]), ebenso lassen sich marine Ziliaten leicht in (mit Leitungswasser) verdünntem Meerwasser kultivieren. Übertragung von Protozoën in Lösungen von hohem osmotischen Druck (1 % KNO_3, 5 % Rohrzucker) führt zu spontanem Zerreißen der Zellen in mehrere (lebende) Stücke[3]) oder zu Deformationen, „Krämpfen" (KORENTSCHEWSKY.[4]) Den Einfluß der Konzentration der Nährlösung auf die Form der Amöben, namentlich auf das Auftreten der Schwimmformen, haben v. WASIELEWSKI und HIRSCHFELD studiert.[5])

Beziehungen zum Sauerstoff. — PÜTTER untersuchte ein anaërobes Protozoon (*Spirostomum ambiguum*) und beschreibt den Einfluß der Sauerstoffzufuhr auf dessen Zellbeschaffenheit.[6]) Unter den parasitisch lebenden Protozoën werden sich gewiß noch zahlreiche anaërobe Arten finden lassen.[7])

Giftwirkungen. — Literatur über den Einfluß verschiedener Gifte (Säuren, Metallsalze u. a.) auf Protozoën findet man z. B. bei v. FÜRTH.[8])

Amöben. Die meisten Versuche, Protozoën zu kultivieren, beziehen sich auf Amöben.[9]) VAHLKAMPF hat betont, daß ein spezifischer Nährboden für besondere Protozoënarten nicht erforderlich sei, und die Ermittlung eines solchen nicht einmal angestrebt werden kann, da die Organismen von Bakterien leben und nicht direkt die im Nährboden ge-

---

1) Üb. d. physiol. Wirkung v. Alkalien u. Säuren in starker Verdünnung (PFLÜGERS Archiv 1898, **73**, 422).

2) Vgl. besonders MASSART, Sensibilité et adaptation des organismes à la concentration des solutions salines (Arch. de Biol. 1889, **9**, 515). Weitere Literaturangaben bei v. FÜRTH (s. Anm. 8).

3) FISCHER, A., Untersuch. üb. Bakterien (Jahrb. f. wiss. Bot., 1895, **27**, 154).

4) Vgl. pharmakol. Unters. üb. d. Wirkung v. Giften auf einzell. Organismen (Arch. f. experim. Pathol., 1902, **49**); DEGEN, s. u. (a. a. O. 205).

5) v. WASIELEWSKI u. HIRSCHFELD, Untersuch. üb. Kulturamöben (Abh. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturw. Kl. 1910, **1**).

6) Die Wirkung erhöhter Sauerstoffspannung auf die lebendige Substanz (Zeitschr. f. allg. Physik, 1904, **3**, 363).

7) Vgl. NÄGLER, K., Entwicklungsgesch. Studien über Amöben (Arch. f. Protistenkunde 1909, **15**, 1).

8) Vergleich. chemische Physiol. der nied. Tiere, Jena 1903, 630. Außer der dort zitierten Literatur vgl. auch MUSGRAVE u. CLEGG a. a. O.; DEGEN, Unters. üb. d. kontraktile Vakuole u. d. Wabenstruktur des Protopl. (Botan. Ztg. 1905, **63**, I, 163); THOMAS, Action of var. chem. subst. upon cult. of Amebae (Bur. gov. lab. Manila, 1905), MOLISCH, H., a. a. O. 1910, s. o. p. 74, Anm. 3. Über den Einfluß fluoreszierender Lösungen vgl. RAABS Untersuchg. (Zeitschr. f. Biol. 1900, **39**, 524 und 1903, **44**, 16) und das oben (p. 78) Gesagte.

9) Die Literatur ist außerordentlich umfangreich. Vgl. die neue Zusammenstellung von G. WÜLKER a. a. O. 1911.

botenen Stoffe aufnehmen. Solange keine Methoden zur bakterienfreien Reinkultur der Amöben gefunden worden sind, spielt freilich die Spezifität des Nährbodens nur eine mittelbare Rolle; vielleicht gelingt es aber doch einmal, diejenigen Stoffe, welche sich die Amöben mit Hilfe ihrer proteolytischen u. a. Fermente aus Bakterien usw. herstellen, ihnen im Nährboden unmittelbar zu bieten und sie dadurch von lebendem Fütterungsmaterial unabhängig zu machen. Das Anwachsen junger Kulturen läßt sich durch hohe Temperaturen (ca. 26°) fördern, da diese der Entwicklung der Bakterien günstig sind (NÄGLER). Geeignete Nährböden erhält man durch Abkochen von Stroh (ca. 20—30 g in 1 l), Heu, Hanf, Gartenerde; ZAUBITZER (a. a. O.) empfiehlt neben anderen verschiedene Peptonkombinationen, z. B. Somatose (0,5—1 %) und Pepton (0,5—1 %), Peptonwasser, HEYDENwasser (Nährstoff HEYDEN 0,5—1 %). Diese und andere Nährflüssigkeiten verarbeitet man mit Agar oder Gelatine; auch andere feste Nährböden wie Kartoffeln (z. B. GORINI) sind mit Erfolg benutzt worden.[1]) Gerühmt wird ferner eine Aufkochung von ca. 5 Teilen „*Fucus crispus*" in 100 Teilen Wasser. Nährlösungen eignen sich nach BEYERINCK nur dann zur Kultur von Amöben, wenn diesen Gelegenheit gegeben ist, sich in einer Kahmhaut anzusiedeln. Derselbe Autor zeigte, daß manche Amöben Gelatine verflüssigen.

VAHLKAMPF verfährt bei der Herstellung von Amöbenkulturen in der Weise, daß er von der Kahmhaut, die sich auf Strohinfus bildet, eine kleine Menge in das Kondensationswasser eines schräg erstarrten Agars überträgt. Auf diesem vermehren sich außer den Amöben auch alle andern dem Strohinfus entstammenden Mikroorganismen; man gewinnt gute Amöbenkulturen, wenn man 2—3 Tage nach der Impfung von den höchst gelegenen Stellen des Agars Organismen in ein neues Agarreagensgläschen überträgt, da die Amöben am Agar hinaufkriechen und die Mehrzahl der anderen Organismen hinter sich lassen.

Die in Erde anscheinend häufige *Amoeba nitrophila*, die BEYERINCK in Gesellschaft der nitritaufbauenden Bakterien fand, kultivierte dieser Forscher auf gereinigtem Agar, dem 0,2 % $NH_4 NaHPO_4 + 4 H_2O$ und 0,5 % Chlorkalium zugesetzt waren. Die Reaktion soll neutral oder schwach alkalisch sein.

Ziliaten. Aus Infusen von Pferdemist, alten Pflanzenblättern, Heu usw. gewinnt man leicht verschiedene Ziliatenformen, wie *Colpidium colpoda, Colpoda cucullus, Stylonichia mytilus, Chilodon cucullulus* usw.; die für Laboratoriums- und Unterrichtszwecke oft begehrten Paramaezien erhält man, wenn man Kiemen oder Stücke vom Fuß der Teichmuschel (*Anodonta*) einige Tage in Wasser liegen läßt. Marine Ziliaten in großer Auswahl stellen sich meist ein, wenn man Stückchen von Meeresalgen (*Fucus* oder dgl.) bei Zimmertemperatur in Meerwasser liegen läßt. Man läßt Ziliaten sich meist in den genannten Flüssigkeiten weiter entwickeln; Stentoren (*Stentor coeruleus*) vermehren sich reichlich, wenn man angefaulte Salatblätter in die Kulturgläser wirft.[2]) Versuche mit festen Nährböden liegen nur wenige vor. Immerhin kommen auch diese für viele Ziliaten — *Colpidium* u. a. — als Substrate in Betracht. Von marinen Ziliaten hielt ich neben anderen namentlich *Cryptochilum nigricans* auf Meerwasser-Agar + Fucusdekokt (*F. serratus*) in überaus fruchtbaren Kulturen. — Bei der Kultur in Flüssigkeiten sieht man die Entwicklung der Ziliaten leider nicht stetig fortschreiten, sondern es treten „Depressionen" ein,

---

1) Vgl. z. B. GORINI, Kult. d. Amöben auf fest. Substr. (ibid. **19**, 785); ZAUBITZER, H., Studium über eine dem Strohinfus entnommene Amöbe (Marburg, Dissertation).

2) PROWAZEK, Beitr. z. Kenntnis d. Regen. u. Biol. d. Protoz. (Arch. f. Protistenkde. 1904, **3**, 44).

auf die sogar völliges Aussterben der Kulturen folgen kann. Das ist offenbar eine Folge schlechter Ernährungsverhältnisse (s. o.) und insbesondere eine Wirkung der Stoffwechselprodukte[1]); um dieser zu begegnen, rät STATKEWITSCH[2]), insbesondere bei Züchtung der empfindlichen Paramaezien die Kultur periodisch mit frischem Wasser zu durchspülen; auch Umrühren der Kultur tut gute Dienste (Verbesserung der Sauerstoffverhältnisse?), ferner Neutralisation des Wassers und Zusatz geringer Mengen von Kalziumphosphat. Um den Paramaezien frische Nahrung zuzuführen und die allzu stark zersetzte alte entfernen zu können, hatte sich BALBIANI so geholfen, daß er fein zerschnittene Blätter in einem Säckchen in die Kulturflüssigkeit hineinhängen ließ und die Füllung des letzteren von Zeit zu Zeit erneuerte.

Über Kultur der Ziliaten in kolloidalen Medien, welche die Bewegung der Organismen verlangsamen, siehe besonders STATKEWITSCH a. a. O.

Auch die im Kloakeninhalt des Frosches heimischen Ziliaten (*Opalina ranarum*, *Balantidium minutum* u. a.) dürften der künstlichen Kultur zugänglich sein. *Nyctotherus* wurde von WALKER gezüchtet[3].)

Piroplasmen. Die Aufgabe, Piroplasmen (z. B. *Piroplasma canis*) zu kultivieren, ist bisher noch nicht gelöst. Die Beobachtung einzelner Stadien gelingt in physiologischer Kochsalzlösung[4]) (0,6—0,8 %).

2. Flagellaten.

Flagellaten finden sich überall in Tümpeln und faulenden Wasseransammlungen; wegen der kultivierbaren Formen (s. u.) wird man den in der Nähe von Mistablagerungen usw. nicht seltenen saftiggrünen Pfützen, welche meist Euglenen in großer Menge enthalten, seine Aufmerksamkeit schenken müssen. Auf farbige marine Flagellaten wird man bei Strandwanderungen durch die grünlichen Anflüge aufmerksam gemacht, die sie auf dem Sande oft entstehen lassen.

Ernährungsweise. — Der Grund, aus welchem wir die Flagellaten getrennt von den ihnen nahe stehenden Protozoën behandeln, liegt in ihrer Ernährungsweise. Manche von ihnen gleichen diesen darin, daß sie sich „tierisch" ernähren und in Reinkulturen daher nicht halten lassen; andere leben saprophytisch, indem sie ihre Nahrung auf osmotischem Wege aufnehmen, und noch andere stellen sich ihren Bedarf an organischer Substanz mit Hilfe assimilierender Chromatophoren selbst her. Solche Formen vermitteln den Übergang zu den autotroph lebenden Algen. — Die Versuche, Flagellaten auf künstlichen Nährsubstraten zu züchten, sind bisher nur bei

---

1) Vgl. z. B. BALBIANI, E., Etudes s. l'action des sels sur les infusoires (Arch. d'anat. micr. 1898, **2**).

2) a. a. O., auch CALKINS, Studies on the life history of Protozoa I. The lifecycle of *Paramaecium caudatum* (Arch. f. Entwickl.-Mech., 1902, **15**, 139).

3) WALKER, E. L., The cultiv. of the paras. flagellata and ciliata of the intestinal tract (Journ. med. res. 1908, **18**, 487).

4) Vgl z. B. DESELER, Br., Beitr. z. Züchtung v. P. in künstl. Nährböden. (Ztschr. f. Hyg. 1910, **67**, 115), MIYAJIMA, M., Cultiv. of a bovine P. etc. (Phil. Journ. of Sci. 1907, **2**, 83; Nährbouillon mit $1/_5$—$1/_{10}$ defibrinierten Blutes).

wenigen Formen geglückt, neuerdings auch bei den als Blutparasiten lebenden Trypanosomen.

Über das in botanischen Gärten gelegentlich auftretende *Chromophyton Rosanoffii* vgl. MOLISCH[1]), über das Verhalten der physiologisch interessanten *Anthophysa vegetans* in eisenhaltigem Leitungswasser und seine Beziehungen zu Mn vgl. ADLER.[2]) —

FRANCÉ teilt einiges über den Einfluß der Züchtung auf das reizphysiologische Verhalten der Flagellaten und über reizphysiologisch verschiedene Rassen mit.[3])

Malariaplasmodien. In defibriniertem oder mit Zitronensäure versetztem Blut konnte BASS anaërob die drei gewöhnlichen Formen der Malariaplasmodien (*Plasmodium vivax, Pl. malariae, Pl. falciparum*) kultivieren; bei der Kultur ist nach der von BASS[4]) vertretenen Auffassung zu berücksichtigen, daß in Individuen, die von Malariaplasmodien (oder auch anderen pathogenen Mikroorganismen) infiziert sind, sich sehr bald große Mengen des gegen die Mikroben wirkenden Ambozeptors befinden; wird derartiges Blut zur Kultur in der gewöhnlichen Weise verwendet, und bleibt die Kultur bei ca. 37° C sich überlassen, so entwickelt sich nach einigen Stunden das Komplement, das in Verbindung mit dem Ambozeptor die Mikroorganismen zerstört und das Angehen der Kultur unmöglich macht. Man hat daher durch Zusatz eines geeigneten Stoffes (z. B. Galle) die Entwicklung des Komplements zu verhindern oder die Kultur bei so hoher Temperatur anzusetzen, daß das Komplement nicht entstehen kann, der ausgesäte Organismus aber auch noch nicht durch sie zerstört wird.

Leishmania. NICOLLE züchtete *L. tropica* in dem Kondenswasser von NOVY-MC NEALschem Blutagar (s. bei Trypanosomen) und bei Verwendung von ganz frischem Agar auch auf seiner trockenen Oberfläche.[5])

Peridineen (Dinoflagellaten). Als kultivierbar ist bisher erst eine Form, das hautlose *Gymnodinium fucorum*, erkannt worden. Es läßt sich meist leicht gewinnen, indem man Fucusmaterial im Laboratorium in Glasdosen oder dgl. einige Tage oder Wochen stehen läßt und von dem zerfallenden Algenmaterial eine Probe in geeignete Nährlösungen überträgt. Als solche empfiehlt KÜSTER Fucusextrakt. Die Peridineen vermehren sich in diesem sehr schnell.[6])

Ochromonas ist von MEYER[7]) (a. a. O. 59ff.) kultiviert worden. Anorganische Ernährung führt zu tieferer Färbung der (gelblichen) Chromatophoren als organische. Verschiedene Zuckerlösungen (Glukose, Saccharose, Maltose u. a.) wurden erfolgreich zur Kultur benutzt. In Pepton ging *O. granulosa* zugrunde. Kultur in N-freier Nährlösung

1) Leuchtende Pflanzen, 2. Aufl. Jena 1912, 2 ff.

2) Über Eisenbakterien in ihrer Beziehung zu den therapeutisch verwend. natürl. Eisenwässern (Zbl. f. Bakt., II, 1904, **11**, 215); dort weitere Literaturangaben.

3) FRANCÉ, R., Exper. Unters. über Reizbeweg. u. Lichtsinnesorgane d. Algen (Zeitschr. f. d. Ausbau d. Entwicklungslehre 1908, **2**).

4) Vgl. BASS, C. C., Neue Gesichtspunkte in d. Immunitätslehre usw. (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1912, **16**, 117).

5) NICOLLE, Ch., et MANCEAUX, L., Cult. de *Leishmania tropica* sur milieu solide (C. R. Soc. Biol. 1911, **70**, 712).

6) KÜSTER, E., Eine kultivierbare Peridinee (Arch. f. Protistenkde. 1908, **11**, 351).

7) MEYER, HANS, Untersuch. über einige Flagellaten. Dissert., Basel 1897.

fördert die Leukosinbildung: „Häufige, besonders mit *Ochromonas granulosa* angestellte Versuche zur Erlangung von Reinkulturen aus wenigen Exemplaren gelangen nie, da die Form nach der Übertragung sich nie vermehrte, sondern regelmäßig schnell zugrunde ging. Dagegen traten häufig die beiden *Ochromonas*arten (*granulosa* und *variabilis*) in solchen Mengen auf, daß sie von selbst eine fast völlige Reinkultur bildeten, wobei aber immerhin das Vorhandensein von andern Formen zwischen den genannten Arten nicht als ausgeschlossen betrachtet werden konnte" (a. a. O. 80).

Monas. *M. amoebina* kultivierte MEYER (a. a. O. 54) in organischen Lösungen, z. B. in Traubenzucker, *M. minima* fand sich in einer Peptonkultur.

Euglenen. Von allen Flagellaten auf dem Wege künstlicher Züchtung am genauesten erforscht ist die von ZUMSTEIN[1]) untersuchte *E. gracilis*. Das für diese Art von ihm Mitgeteilte dürfte auch für manche andere Euglenen seine Gültigkeit haben. *E. gracilis* vermag auf KNOPscher Nährlösung (0,05—0,8) zu gedeihen; besser ist das Wachstum auf einer der beiden folgenden Lösungen:

0,5 g Pepton	1,00 g Pepton
0,5 „ Traubenzucker	0,4 „ Traubenzucker
0,2 „ Zitronensäure	0,4 „ Zitronensäure
0,02 „ $MgSO_4 + 7 H_2O$	0,02 „ $MgSO_4 + 7 H_2O$
0,05 „ KH_2PO_4	0,05 „ KH_2PO_4
100 ccm Wasser.	0,05 „ NH_4NO_3
	98 ccm Wasser.

Die Zitronensäure wird selbst in hohen Konzentrationen (1—2 %) gut vertragen und gestattet bei Kultur in leicht faulenden Flüssigkeiten (Erbsenwasser u. dgl.) den Ausschluß der Bakterien. — Stellt man eine am Licht gehaltene Kultur grüner Euglenen in organischer Nährlösung ins Dunkle, oder überträgt man die Euglenen aus einem ziemlich erschöpften Nährmedium in ein an organischer Substanz sehr reiches (z. B. Erbsenwasser oder Fleischextraktgelatine), so wird die grüne *Euglena*form in die farblose *Astasia*form übergeführt. — Auch auf festen Nährböden (Gelatine, Agar) wächst E. recht gut.

Mitteilungen über kultivierbare marine Euglenen und Flagellaten anderer Art (auch blaugrüne) bei SCHÜLLER.[2])

Darmbewohnende Flagellaten *(Cercomonas, Bodo, Trichomonas, Monocercomonas)* kultivierte WALKER in bakterienhaltigen Mischkulturen.[3])

Trypanosomen.[4]) Die Aufgabe, Trypanosomen, typische Blutparasiten, außerhalb des Tierkörpers zu kultivieren, wurde vor einigen Jahren von MC NEAL und NOVY gelöst.

1) Zur Morph. u. Phys. d. *Euglena gracilis* KLEBS (Jahrb. f. wiss. Bot. 1900, **34**, 149; daselbst weitere Literaturangaben).

2) SCHÜLLER, J., Üb. d. Ernährungsbeding. einiger Fl. d. Meerwassers (Wiss. Meeresuntersuch., Abt. Kiel. N. F. 1910, **11**, 347 .

3) WALKER, E. L., The cultiv. of the paras. flagellata and ciliata of the intest. tract. (Journ. med. res. 1908, **18**, 487).

4) Zusammenfassende Arbeiten: LAVERAN u. MESNIL, Trypanosomes et trypanosomiases, Paris 1904; NOCHT u. MAYER, M., Trypanosomen als Krankheitserreger (Handb. d. pathog. Mikroorganismen, Ergänzungsband, Jena 1906/1907, 1).

Die Tr. wachsen auf Agar und defibriniertem Tierblut, welche die genannten Autoren[1]) im Verhältnis von 5 : 1, später 2 : 1 zu mischen vorschlugen. Das Hämoglobin scheint eine für das Gedeihen der Tr. wesentliche Bedeutung zu haben, seine Zersetzung (in Hämatin?) hindert ihre Entwicklung; am geeignetsten ist Kaninchenblut.

Relativ leicht kultivierbar ist *Tr. Lewisi*, das Rattentrypanosoma. Der Nähragar, den Mc Neal und Novy benutzten, enthält 1—3 % Pepton und defibriniertes Blut im angegebenen Verhältnis. Die Verfasser impfen das Kondenswasser und bewahren die Kulturen bei Zimmertemperatur oder bei 34—37° C auf. Nach einem weiteren Rezept nehmen dieselben Autoren

2 Teile Agar,
1 Teil Rattenblut,
1 Teil einer Lösung, welche 1 % Glykokoll und 1 % asparaginsaures Natrium enthält.

Nach dem Erkalten wird defibriniertes Kaninchenblut zum Kondensationswasser zugefügt. Das Maximum der Entwicklung erreichen die Kulturen nach 8—12 Tagen; dann muß übergeimpft werden.

Nocht und Mayer (a. a. O. 17) nehmen Agar und defibriniertes Blut zu gleichen Teilen. Vor der Impfung werden die gefüllten Reagensröhrchen 24 Stunden bei 37° gehalten. Das trypanosomenhaltige Blut wird mit der Führschen Spritze unmittelbar dem Herzen der chloroformierten Ratte entnommen; die erste Generation wird durch Impfung mit drei Tropfen aus steriler Pipette erhalten.

Für *Tr. Brucei* (Naganakrankheit der Rinder, Esel, Pferde u. a.) empfehlen Mc Neal und Novy

Extrakt von 125 g Rindfleisch in 1000 g Wasser	
Agar	20 „
Pepton	20 „
Kochsalz	4 „
$NaCO_3$ (Normallösung)	10 ccm

Bei 55—60° werden 2 Teile defibrinierten Kaninchenblutes mit 1 Teil Agar vermischt. Temperaturoptimum bei 25°.

Eine Modifikation des Novy-Mc Nealschen Nährbodens benutzt Mathis[2]), der eine Mischung von 1 Teil Nähragar und 1—2 Teilen defibriniertes Blut (Rind, Pferd) ein oder mehrere Male auf 75—100° oder ½ Stunde auf 120° erhitzt; der Agar soll schräg erstarren; das Kondenswasser wird beimpft.

Nicolle arbeitet mit folgender Modifikation:

dest. Wasser	900 ccm
Agar	14 g
Na Cl	6 „

1) Cultivation of *Trypanosoma Lewisi* (Contrib. to med. research. to V. C. Vaughan, Juni 1903; vgl. Zeitschr. f. wiss. Mikr. 1904, **21**, 372); On the cultivation of *Tr. Brucei* (Journ. of inf. dis. 1904, **4**, 1); The life history of *Tr. Lewisi* and *Brucei* (ibid. 1904, **1**, 517). Vgl. ferner Prowazek, Studien über Säugetiertrypanosomen (Arb. Kais. Ges.-Amt **22**, H. 2, 351); Nocht u. Mayer a. a. O.

2) S. une modific. du milieu de Novy-Mc Neal pour la culture des Tr. (C. R. Soc. Biol., 1906, **61**, 550).

Zu je 2 Teilen Agar kommt 1 Teil defibriniertes Kaninchenblut; die Mischung wird bei 45—50° vorgenommen.[1])

Das im Blut des Waldkauzes (*Syrnium alco*) gefundene *Halteridium* kultivierte Mayer und beobachtete seine Umwandlung zu Flagellaten.[2])

Besonders leicht kultivierbar sind die Trypanosomen der Vögel, wie Mc Neal und Novy zeigten.[3]) Auch die Froschtrypanosomen wurden bereits erfolgreich in Kultur genommen.[4])

3. Myzetozoën (Myxomyzeten).

Schleimpilze (Myzetozoën, Myxomyzeten) lassen sich nicht so leicht gewinnen wie Vertreter der andern Hauptgruppen der Mikroorganismen. Man durchsuche in Zersetzung begriffenes Pflanzenmaterial, alte Blätter, faulendes Stroh, moderndes Holz usw. nach dem weitverbreiteten *Chondrioderma difforme*, nach *Didymium* u. dgl. Über die Standorte der häufigsten einheimischen Schleimpilze in Wald und Feld geben die üblichen Kryptogamenfloren Aufschluß. An zersetztem Holz usw. kann man im Laboratorium Myzetozoën sich entwickeln sehen.

Ernährungsweise. — Die Myzetozoën leben offenbar in erster Linie von Bakterien, wenigstens ist ihre Kultur ohne Bakterien noch nicht einwandsfrei gelungen.[5]) Die Sachlage ist bei den Schleimpilzen somit eine ähnliche wie bei den Protozoën; doch ist es keineswegs ausgeschlossen, daß auch osmotische Nahrungsaufnahme bei den Schleimpilzen eine große Rolle spielt; für *Dictyostelium mucoroides* hat es Potts (s. u.) durchaus wahrscheinlich gemacht, daß eine extrazelluläre Verdauung der Futterbakterien stattfindet, d. h. daß von den Schleimpilzen proteolytische Fermente ausgeschieden und die Produkte der Proteolyse von ihnen aufgenommen werden.

Nährböden. — Die Schleimpilze (samt den unerläßlichen Bakterien) können in Nährlösungen und auf festen Nährböden kultiviert werden. Vorzügliche Nährlösungen sind Dekokte von Maiskörnern, trockenen *Vicia*stengeln, ferner Dekokte von Heu, Holz, Lohe, Kiefernadeln, Eicheln, *Polyporus* u. a. m. Auf 2 %igem Agar, der z. B. mit Maiskörnerdekokt hergestellt ist, wachsen viele Myxomyzeten vortrefflich. *Vicia*agar kann man sich so herstellen, daß man verflüssigten Agar in Petrischalen oder dgl. auf trockene

1) Nicolle, Kalar-Azar infantile (Ann. Inst. Pasteur 1909, **23**, 361).

2) Mayer, M., Üb. ein *Halteridium* und *Leucocytoon* des Waldkauzes und deren Weiterentwicklung in Stechmücken (Arch. f. Protistenkunde 1911, **21**, 232).

3) On the trypanosoma of birds (Journ. of infect. diseases 1905, **2**, 286); Thiroux, Rech. morphol. et expér. sur *Trypanosoma paddae* (Ann. Inst. Pasteur 1905, **19**, 65).

4) Lewis, J., u. Williams, H. V., The results of attempt to cultivate trypanosomes from frogs (Soc. f. exp. Biol. and Medic., Febr. 1905); Bouet, G., Culture du Trypanosome de la grenouille (Ann. Inst. Pasteur, 1906, **20**, 564), Mathis, a. a. O.

5) Vgl. Nadson, Potts (s. u.) und Pinoy, Rôle des bact. dans le dével. de cert. Myx. (Thèse Paris 1907; auch Ann. Inst. Pasteur 1907, **21**, 622). Nécessité d'une symbiose microbienne pour obtenir la culture des Myxomyc. (Bull. Soc. myc. de France 1902, **18**). Andrer Ansicht ist Brefeld (s. u.). – Über Ernährung mit Hefe vgl. Chrzaszcz, *Physarum leucophaeum ferox*, eine hefefressende Amöbe (Zbl. f. Bakt., II, 1902, **8**, 431).

Stengelstücke von *Vicia* aufgießt und hiernach sterilisiert: bei der Sterilisation diffundieren hinreichende Mengen von Nährstoffen in den Agar. Auch als feste Nährböden kommen die soeben genannten Objekte in Betracht; DEGEN[1]) kultivierte *Aethalium septicum* auf Löschpapier, das mit Lohedekokt durchtränkt war. Wichtig ist, daß man nicht allzu N-reiche Nährböden den Schleimpilzen bietet, da auf diesen die Bakterien zu üppig sich entwickeln. — Von festen Nährböden wurden weiterhin bereits erprobt: Lohe für *Aethalium septicum* (CONSTANTINEANU)[2]), Mist für *Dictyostelium*, *Stereum*-Fruchtkörper für *Badhamia* (LISTER)[3]), Mohrrüben für *Licea* (CIENKOWSKY)[4]) u. a. m. Über organische Nährlösungen von bekannter Zusammensetzung finden sich einige Angaben z. B. bei CONSTANTINEANU a. a. O., welcher auch Bimsstein mit verschiedenen Lösungen durchtränkte und auf ihm Schleimpilze züchtete.

Keimung, Schwärmer. — Nach CONSTANTINEANU keimen alle Myzetozoënsporen bereits in reinem Wasser.[5]) Säure (H-Ionen) lockt die Schwärmer an, Alkali (OH-Ionen) stößt sie ab.[6])

Plasmodien- und Fruchtbildung. — Zahlreiche Angaben bei CONSTANTINEANU: unter dem Einfluß von Feuchtigkeit bilden *Aethalium*, *Badhamia* und *Leocarpus* stets Zysten, während Trockenheit bei *Aethalium* fast stets Fruktifikation, bei *Amaurochaete*, *Badhamia*, *Leocarpus* u. a. Enzystierung bewirkt. Frühzeitige Fruchtbildung bei einem Teil des Plasmodiums ruft man hervor, indem man die Nährstoffe durch Wasser entzieht (*Didymium* u. a.) oder Nahrungsaufnahme durch Trockenheit verhindert (*Aethalium*). Bei *Physarum didermoides* wird durch seine Stoffwechselprodukte die Fruchtbildung beschleunigt, das Plasmodium von *Didymium effusum* enzystiert sich unter ihrem Einfluß. — KLEBS zeigte, daß man Plasmodien von *Didymium* ohne Sporenbildung jahrelang kultivieren kann, wenn man dafür sorgt, daß das Plasmodium stets rechtzeitig auf nährstoffreiches Substrat übertragen wird.[7])

Dictyostelium mucoroides, ein auf Pferdemist nicht seltener Myxomyzet, ist besonders durch die trefflichen Untersuchungen von POTTS[8]) gut bekannt. Auf sterilisiertem Mist,

1) a. a. O. (oben p. 98, Anm. 8).

2) Üb. d. Entwicklungsbedingung. d. Myxomyzeten (Ann. Mycol. 1906, **4**, 495, auch Dissertation Halle 1906).

3) Notes on the plasmodium of B. (Ann. of Bot. 1888, **2**, 1).

4) Z. Entwicklungsgesch. d. Myxomyz. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1863, **3**, 325).

5) DE BARY, Die Myzetozoën (Schleimpilze) 1864. Vgl. ferner LISTER, On the cultivation of mycetozoa from spores (Journ. of Bot. 1901); JAHN, Myxomyzetenstudien 4: Die Keimung der Sporen (Ber. d. D. Bot. Ges. 1905, **23**, 489).

6) KUSANO, S., Stud. on the chemotactic a. oth. relat. react. of the swarmsp. of M. (Journ. Coll. Agricult., Tokyo 1908, **2**, 1).

7) Einige Ergebnisse der Fortpflanzungsphysiologie (Ber. d. D. Bot. Ges. 1900, **18**, 201).

8) Zur Physiol. d. D. m. (Flora 1902, **91**, 281, auch Dissertation Halle 1902). Ferner BREFELD, D. m., ein neuer Organismus aus d. Verwandtschaft d. Myxomyz. (Abh. SENCKENBERG. Naturf. Ges. 1869, **7**, u. Unters. Gesamtgeb. Mykologie 1884, **6**).

Viciastengel- und Maiskörnerdekokten und Agar von diesen leicht kultivierbar. Extrazelluläre Verdauung der — nach POTTS — unerläßlichen Bakterien (s. o.). Gute N-Quellen: Ammoniumnitrat, Asparagin, Legumin, Kaseïn, Nukleïn, Harnsäure; gute C-Quellen: Zucker, Glyzerin. Pepton und Leuzin liefern gleichzeitig C und N. Von Mineralstoffen wurden geboten K_3PO_4 und $MgSO_4$. — Bei Nahrungsmangel Fruchtbildung. Noch nicht genügend erklärt ist die Erscheinung, daß die Amöben in dicht geschlossenen Deckeldosen absterben (POTTS).

Die sorgfältigen Untersuchungen PINOYS (1907 a. a. O.) haben von neuem die Abhängigkeit der Myxomyzeten von Bakterien dargetan. Bakterienfrei fand P. nur diejenigen Kulturen, aus welchen die Bakterien bereits verschwunden waren; eine weitere Entwicklung ist solchen Schleimpilzkulturen nicht möglich. — Nach PINOY werden die Bakterien durch das Zusammenleben mit Schleimpilzen wesentlich verändert (Verlust der Fluoreszenz bei *Bac. fluorescens var. liquefaciens*, Änderungen im Verflüssigungsvermögen). Bei demselben Autor Angaben über Kultur der Myxomyzeten mit Pigmentbakterien.

NADSON[1]), der die Bedeutung der Bakterien für die Entwicklung der Myxomyzeten erkannte, kultivierte *Dictyostelium* mit Bakterien, gibt aber gleichzeitig an, auch bakterienfreie, allerdings abnorm wachsende Reinkulturen gewonnen zu haben. Nachdem POTTS sich um bakterienfreie Kultur der Myxomyzeten vergebens bemüht hat, verdient die NADSONsche Beobachtung ihrer prinzipiellen Wichtigkeit wegen erneute Nachprüfung.

4. Algen.

Versuche mit Algen kann man mit den weitverbreiteten Grünalgen beginnen, die auf feuchten Mauern und Steinen, auf feuchter Gartenerde, an Baumstämmen usw. die wohlbekannten grünen Überzüge bilden (*Pleurococcus, Stichococcus, Chlorococcum, Hormidium* usw.), oder mit den fädigen Bewohnern unserer Tümpel (*Cladophora, Oedogonium, Spirogyra*). Zyanophyzeen liefert feucht gehaltener Sand oder Gartenerde, alte Blumentöpfe usw., die auch allerhand Diatomeen zu beherbergen pflegen.

Ernährungsweise. — Die Algen als chlorophyllhaltige Organismen sind zur Assimilation der Kohlensäure befähigt und kommen somit bei künstlicher Kultur mit Zufuhr von anorganischen Stoffen aus. Algen, welche neben den Produkten ihrer Assimilationstätigkeit noch organische Ernährung haben müssen oder als farblose Parasiten oder Saprophyten auf diese völlig angewiesen sind, gehören zu den Ausnahmen.

Nährböden. — Die Algen wachsen, ihrem natürlichen Vorkommen entsprechend, vorzüglich in Nährlösungen, doch vortrefflich auch auf allerhand festen — starren und gelatinösen — Nährböden (Gips, Ton, Bimsstein, Sand, Kieselsäuregallert, Gelatine, Agar). Manche Algen verflüssigen Gelatine, einige Diatomeen auch den Agar. — Im allgemeinen wird man mit Kultur in Dosen und Glasschalen oder auf Tellern, mit Petrischalen und Reagensgläsern zu arbeiten haben.

---

1) Des cultures du *Dictyostelium mucoroides* BREF. et des cultures pures des Amibes en général (Extr. Scripta Botanica fasc. 15).

Anorganische Nahrung. — Der Befähigung der Algen zur Assimilation der Kohlensäure entspricht es, daß man in erster Linie anorganische Nährlösungen zu ihrer Kultur verwendet. Nährlösungen wie die von KNOP oder TOLLENS (s. o. S. 17) sind gute Nährmedien. MOLISCH empfiehlt folgende Lösung:

1000	g	Wasser
0,2	„	KNO_3
0,2	„	K_2HPO_4
0,2	„	$MgSO_4$
0,2	„	$CaSO_4$

und legt Wert auf das Dikaliumphosphat, das der Lösung schwach alkalische Reaktion gibt.

BEYERINCK[1]) kultiviert in

100	g	Wasser
0,05	„	NH_4NO_3
0,02	„	KH_2PO_4
0,02	„	$MgSO_4$
0,01	„	$CaCl_2$
Spur		$FeSO_4$.

ARTARI[2]) nimmt

NH_4NO_3	0,25 %
K_2HPO_4	0,1 %
$MgSO_4$	0,025 %
$FeCl_3$	Spuren

oder ähnliche Kombinationen.

KLEBS benutzte KNOPsche Lösung nach folgendem Rezept[3]):

4	Teile	$Ca(NO_3)_2$
1	Teil	KH_2PO_4
1	„	KNO_3
1	„	$MgSO_4$

auf 0,2—1 % verdünnt.

Von den genannten enthalten die KNOPsche Lösung, die TOLLENSsche und BEYERINCKs Mischung Ca, das für die meisten Algen überflüssig zu sein scheint. MOLISCH und BENECKE[4]), die die Ansprüche der Algen an Mineralstoffe eingehend geprüft haben, konstatierten Ca-Bedürfnis nur für *Spirogyra* und *Vaucheria*. Ob auf die in Ca-freien Lokalitäten vorkommenden Algen Kalzium bei künstlicher Kultur schädigend wirkt, ist wahrscheinlich, bedarf aber noch der näheren Untersuchung. K ist unentbehrlich und mag als Kaliumphosphat oder Kaliumnitrat geboten werden; K-freie Na-Kulturen

1) Notiz über *Pleurococcus vulg.* (Zbl. f. Bakt. II, 1898, **4**, 785).

2) Der Einfluß der Konzentrationen der Nährlösungen auf die Entwicklung einiger grüner Algen (Jahrb. f. wiss. Bot. 1906, **43**, 177).

3) Beding. d. Fortpflanz. bei einigen Algen und Pilzen, Jena 1896, 8.

4) BENECKE, Über Kulturbedingungen einiger Algen (Botan. Ztg. 1898, **56**, 83).

wachsen sehr schwach oder gar nicht. Mg (als $MgSO_4$ oder $MgCl_2$ geboten) ist unentbehrlich, doch machen sich die Folgen Mg-freier Züchtung wie bei höheren Pflanzen oft erst sehr spät geltend (Benecke). Gute P-Quellen sind Kalium- und Ammoniumphosphat, gute N-Quellen KNO_3, $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$ und Ammoniumphosphat, — letzteres liefert N und P gleichzeitig. — N-frei kultivierte Algen fallen durch das gesteigerte Längenwachstum der Zellen auf („Etiolement aus Stickstoffhunger") und die Reduktion ihrer Chloroplasten (z. B. bei Vaucheriakeimlingen). N-Mangel bei Gegenwart von P steigert die Produktion von Geschlechtsorganen, Keimlinge von Vaucherien bedecken sich über und über mit solchen (Benecke). — S wird als $MgSO_4$ gegeben.

Reaktion der Nährlösung. — Im allgemeinen gilt der Satz, daß die Algen in alkalischer Flüssigkeit besser gedeihen als in saurer (Molisch, Benecke, Klebs a. a. O.), insbesondere gegen freie Säuren sind Algen sehr empfindlich[1]; übrigens sind auch Algen bekannt, die noch in schwachsaurer Lösung gut wachsen (*Hormidium*, Benecke).

Konzentration. — Es genügt für sehr viele, vielleicht für die meisten Süßwasseralgen schon eine sehr geringe Konzentration der Nährlösung (z. B. 0,1—0,5 %), andererseits wird von vielen selbst sehr hohe Konzentration gut vertragen (Famintzin, A. Richter, Artari u. a.[2]). Die optimale Konzentration liegt bei verschiedenen Arten natürlich sehr ungleich hoch. Artari gibt an, daß *Stichococcus* am besten in einer Lösung wächst, welche 0,5—1 % der Stickstoffquelle und 1—2 % Glukose oder Rohrzucker enthält, während *Scenedesmus caudatus* schwache Lösungen (0,125—0,062 % Glukose, 0,062—0,031 % Stickstoffquelle) bevorzugt.

Die Meeresalgen vertragen bei allmählicher Gewöhnung sehr hohe Konzentrationen von $NaCl$; nach Gerneck erträgt *Chlorococcum* noch konzentrierte KNO_3-Lösung (ca. 30 %). Das Nonplusultra stellt in ihrer Widerstandsfähigkeit die besonders von Teodoresco[3]) studierte *Dunaliella* dar; ich kultivierte sie jahrelang in einer mit $NaCl$ gesättigten Knopschen Nährlösung, in der bereits seit langem große Kochsalzkristalle ausgefallen waren. — Auf die Widerstandsfähigkeit der Zyanophyzeen hochkonzentrierten Lösungen gegenüber machte Cavara[4]) aufmerksam.

---

1) Über den Einfluß geringer Mengen H_3PO_4 auf das Wachstum der *Spirogyra* vgl. Migula, Üb. d. Einfl. stark verdünnter Säuren (Dissert. Breslau 1888).

2) Famintzin, A., Die anorganischen Salze als ausgezeichnetes Hilfsmittel zum Studium der Entwicklungsgeschichte der niederen Pflanzenformen (Mel. biol. Acad. imp. Sc., St. Petersbourg, 1871, **13**); Richter, A., Über die Anpassung der Süßwasseralgen an Kochsalzlösungen (Flora 1892, **75**, 4); Artari, A., Der Einfluß der Konzentrationen der Nährlösungen auf die Entwicklung einiger grüner Algen I und II (Jahrb. f. wiss. Bot. 1904, **40**, 593 und 1906, **43**, 177, vgl. ferner 1909, **46**, 443), Gerneck s. u.

3) Organisation et développ. du D. etc. (Beih. z. Bot. Zbl. I, 1905, **18**, 215).

4) Resist. fisiol. del *Microcoleus chtonoplastes* Thur. etc. (N. Giorn. bot. ital. N. S. 1902, **9**, 59).

Licht. — Als chlorophyllhaltige Organismen beanspruchen die Algen zu normalem Gedeihen im allgemeinen Licht — natürliches oder künstliches; doch kann durch Zufuhr organischer Nahrung (s. u.) manchen Algen auch im Dunkeln Fortentwicklung möglich gemacht werden.

Stichococcus bacillaris wächst nach Nadson in blauem Lichte erheblich besser als in rotem; bei Zusatz organischer Stoffe zum Nährboden (Pepton, Glukose) ist der Unterschied nicht so deutlich wie bei rein anorganischer Ernährung.[1] Nachprüfung und Erweiterung der Nadsonschen Ergebnisse wären erwünscht. Über die Entwicklung der Diatomeen in monochromatischem Licht vgl. Meinhold (s. u.); den Einfluß verschiedenfarbigen Lichtes auf die Färbung der Oszillarien haben Gaidukov, neuerdings Magnus und Schindler untersucht.[2]

Wirkung organischer Nahrung. — Für die grünen Algen und überhaupt für die assimilierenden ist organische Nahrung offenbar überflüssig. Ein anderes ist es, daß von vielen organische Nahrung verwertet werden kann. Die Wirkung organischer Ernährung auf die Algen ist bei verschiedenen Formen sehr verschieden. Zunächst sind diejenigen zu nennen, welche organische Substanzen durchaus verschmähen: nach Beyerinck[3] gehören zu diesen gewisse Zyanophyzeen, nach v. Deldens Untersuchungen ein ulothrixähnlicher Organismus.[4] Solche Lebewesen müssen auf sorgfältig ausgewaschenem Agar kultiviert werden. Eine weitere Gruppe stellen diejenigen Algen dar, welche zunächst, wenn sie in Kultur genommen werden, den Vertretern der vorigen Gruppe gleichen, sich aber nach und nach an organische Nahrung gewöhnen. Nach Beyerinck (1898 a. a. O.) gehört *Pleurococcus* hierher. Drittens gibt es Algen — und sie sind offenbar sehr zahlreich —, die von vornherein organische Nahrung nehmen: viele einzellige Grünalgen wie *Cystococcus humicola, Stichococcus bacillaris, Chlorella vulgaris* u. a.[5]), die Desmidiazeen und Diatomeen (s. u.). Nach Matruchot und Molliard[6] fördert schon 0,03 % Glukose die Entwicklung der Algen, Artari[7] gibt

---

1) Nadson, G. A., Über den Einfluß des farbigen Lichtes auf die Entwicklung des *Stichococcus bacillaris* Naeg. in Reinkulturen (Bull. jard. imp. bot. St. Petersbourg 1910, **10**, 137; vgl. Zbl. f. Bakt. II, 1911, **31**, 287).

2) Gaidukov, N., Üb. d. Einfl. farbigen Lichtes auf die Färbung lebender Oszill. (Anh. Abhandl. Akad. Wiss. Berlin 1902), Weit. Unters. üb. d. Einfl. farb. Lichtes auf die Farben der O. (Ber. d. D. Bot. Ges. 1903, **21**, 484). Magnus, W., u. Schindler, B., Über den Einfluß d. Nährl. auf d. Färb. der Oszill. (ibid. 1912, **30**, 314).

3) Über oligonitrophile Mikroben (Zbl. f. Bakt. II, 1901, **7**, 561).

4) Mitgeteilt von Beyerinck, Notiz über *Pleurococcus vulgaris* (ibid. II, 1898, **4**, 785).

5) Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien u. and. nied. Algen (Bot. Ztg. 1890, **48**, 725).

6) Variations de structure d'une algue verte sous l'influence du milieu nutritif (Rev. gén. de Bot. 1902, **14**, 193).

7) a. a. O., 1904, **40**, 608.

dasselbe bereits für 0,005 % an. Das Optimum liegt für *Chlorella communis* bei 2 %.

Eine letzte Gruppe von Algen wird von denjenigen Formen gebildet, für welche organische Nahrung notwendig ist. Es handelt sich um Algen, die BEYERINCK (a. a. O.) als Peptonorganismen erkannt hat, und die bei Amido- oder Nitraternährung nur kümmerlich gedeihen; bisher hat sich dergleichen nur für die aus einigen Flechten isolierten Gonidien nachweisen lassen.

Welche Erscheinungen ruft die organische Ernährung an Organismen hervor, die auch ohne diese auskommen? Über den Einfluß auf Wachstum und Fortpflanzung vergleiche man namentlich KLEBS' Untersuchungen. Erscheinungen weiterhin, die namentlich für den Habitus der Kultur von Bedeutung sind, beobachtete BEYERINCK (1898 a. a. O.) an *Pleurococcus vulgaris*: die Zellenanhäufungen in den stark geförderten Kulturen führten dazu, daß die oberen Schichten als trockenes Pulver auf den unteren lagen und leicht von diesen abgeschüttelt werden konnten. Wichtig ist der Einfluß auf die Chlorophyllbildung. Von verschiedenen Seiten ist festgestellt worden, daß organisch ernährte Algen blaß und sogar farblos werden können. Eingehende Angaben verdanken wir z. B. ARTARI.[1]) *Scenedesmus caudatus* wächst in 0,5 % Glukose grün, in 3—5 % farblos weiter; *Sc. acutus* wird nach BEYERINCK in 12 % Maltose farblos; über das ähnliche Verhalten gewisser Flagellaten (*Euglena*) s. o. p. 102. *Stichococcus* wurde von ARTARI in folgender Nährlösung gezüchtet:

Traubenzucker	1 %
KH_2PO_4	0,3 %
$MgSO_4$	0,1 %
$CaCl_2$	0,1 %
Fe_2Cl_6	Spuren[2]) und
von der Stickstoffquelle	0,5 %.

Bei Ernährung mit Pepton, Asparagin und weinsaurem Ammonium bleiben die Kulturen auch im Dunkeln schön grün, bei Leuzin- und besonders Kalisalpeterernährung werden sie farblos; ans Licht gebracht ergrünen die Kulturen wieder.[3])

Dieselbe Reduktion der Chromatophoren wie bei grünen Algen tritt bei organischer Ernährung in den Diatomeenzellen ein.[4])

---

1) Über die Bildung des Chlorophylls durch grüne Algen (Ber. d. D. Bot. Ges. 1902, **20**, 201); RADAIS, S. la cult. pure d'une algue verte; formation de chlorophylle à l'obscurité (C. R. Acad. Sc. Paris 1900, **130**, 793); BOUILHAC, R., S. la cult. du *Nostoc punctiforme* en présence du glucose (ibid. 1898, **126**, 880); Sur la végét. du N. p. en présence de différents hydrates de carbone (ibid. 1901, **133**, 55) u. a. m.

2) Im Original durch Druckfehler anders angegeben.

3) Ausführlicheres über den Effekt künstlicher organischer Ernährung hat OLTMANNS (Morphol. und Biol. d. Algen, Jena 1905, **2**, 155ff.) zusammengestellt.

4) MEINHOLD, TH., Beitr. z. Phys. d. Diat. (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1911, **10**, 353).

Von Rezepten für organische Nährlösungen und Nährböden für Algen mögen außer dem schon angeführten ARTARIschen noch einige von BEYERINCK[1]) empfohlene genannt werden:

I.	Gelatine (durch Pankreas verflüssigt)	1 %
	Salpetersaures Ammoniak	0,5 %
	Phosphors. Kalium	0,5 %
	Gelatine	8 %
	Wasser	90 %

II.	Rohrzucker	1 %
	Asparagin	0,2 %
	Pepton	0,8 %
	Gelatine	8 %
	Wasser	90 %

III.	Malzextrakt	89 %
	Glukose	2,9 %
	Pepton	0,05 %
	Asparagin	0,05 %
	Gelatine	8 %

Reinkulturen. — Will man den Entwicklungsgang einer Alge ermitteln und vor den Irrtümern und Verwechslungen, durch welche selbst hervorragende Algenkenner sich zu der Meinung vom „Pleomorphismus" der Algen führen ließen, sich mit Sicherheit bewahren, so muß man Reinkulturen anlegen, in welchen nur eine Algenspezies enthalten ist. Gewißheit hierüber ist nur möglich, wenn man nur ein Exemplar in die im übrigen sterile Nährlösung ausgesät hat. Die Systematik der niederen Algen verdankt solchen „Reinkulturen" schon manche Klärung. Handelt es sich aber darum, die physiologischen, insbesondere die ernährungsphysiologischen Eigentümlichkeiten einer Alge zu erforschen, so wird es nötig sein, nicht nur fremde Algenarten, sondern auch Bakterien oder sonstige Mikroorganismen von den Kulturen fernzuhalten und diese absolut rein anzulegen.

BEYERINCK[2]), dem wir die ersten Algenreinkulturen verdanken, hat eine Methode beschrieben, Algen zu isolieren und rein zu kultivieren, die schon vortreffliche Resultate geliefert hat und für viele Zwecke sich durch keine bessere hat ersetzen lassen. BEYERINCK stellt mit Grabenwasser — das bereits hinreichende Mengen von Nährstoffen enthält — eine 10 %ige Gelatine her und setzt ihr vor dem Erstarren ein Tröpfchen der algenhaltigen Flüssigkeit zu: die Gelatine wird in Schalen gegossen und erstarrt in diesen. Auf diesen Nährböden, die den Bakterien nur sehr langsame Entwicklung möglich machen, bilden sich — allerdings recht kleine — Algenkolonien, von welchen man durch Überimpfen reine Kulturen gewinnen kann.

BEYERINCK isolierte und kultivierte zunächst *Scenedesmus acutus*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorosphaera viridis*, Gonidien aus Flechten u. a., KRÜGER isolierte später die biologisch interessanten *Chlorotheca*formen, die in farbloser und grüner Form sich züchten lassen, MATRUCHOT und MOLLIARD

1) Over gelatine culturen van eencellige groenwieren (Verh. Prov. Utrechtsch Genootsch. Kunst en Wentensch. 1889, 35; vgl. Zbl. f. Bakt. 1890, 8, 460).

2) Kulturversuche usw. a. a. O.

Stichococcus, weiterhin arbeiteten Artari, Charpentier, Grintzesco u. a.[1]) mit den gleichen Methoden. Es steht zu erwarten, daß diese noch zu vielen wertvollen Aufschlüssen führen werden.

Wie man bei freibeweglichen, schnell wandernden Algen zu Reinkulturen kommen kann, wird bei Besprechung der Diatomeen geschildert werden.

Unentbehrlich sind Reinkulturen namentlich dann, wenn organische Nährmaterialien den Algen geboten werden sollen. Genügt aber anorganische Ernährung, so stört die Einschleppung von Bakterien vielfach nicht. Klebs[2]) fand es ausreichend, die gewünschten Algen — zunächst noch neben anderen Formen — in 0,2—0,4 %iger Knopscher Lösung sich vermehren zu lassen und dann mit einer feinen Glaspipette unter dem Mikroskop den gesuchten Organismus herauszuheben; sind mehrere Algen in die Pipette gestiegen, so verteilt man das Material in einem reinen Tropfen der Kulturflüssigkeit und sucht abermals die gewünschte Spezies von den andern zu trennen. Die isolierten Algen kultiviert man auf Sand, Gips, Ton, Backsteinen oder auf sterilisiertem Lehm, Baumrinde oder gelatinierenden Böden. Klebs empfiehlt (a. a. O.) 0,5 %igen Agar, der mit verdünnter Knopscher Nährlösung hergerichtet wird. Derselbe Autor machte mit Kieselsäuregallerte gute Erfahrungen. In allen Fällen wird zu beachten sein, daß mit dem in der Luft schwebenden „Staub" auch Algenkeime (*Hormidium*, Protokokkoideen) eine bisher „reine" Algenkultur verunreinigen können. Wenn es möglich ist, bei der Kultur von dickwandigen Zygo- oder Oosporen auszugehen, dürfte die desinfizierende Vorbehandlung mit giftigen Lösungen (z. B. Formalin in geeigneten Verdünnungen) die Arbeit des Isolierens wohl erleichtern.

Das Fernhalten der Bakterien gehört selbst bei Anwendung anorganischer Medien zu den größten Schwierigkeiten und ist wohl oft genug überhaupt unmöglich, da die Bakterien zu fest an den gallertigen Membranen der Algen oder gar in diesen sitzen. Für marine Algen haben Benecke, Keutner und Keding[3]) gezeigt, daß *Azotobacter* ständig an ihrer Ober-

1) Krüger, W., Beitr. z. Kenntnis der Organismen des Saftflusses der Laubbäume (Zopfs Beitr. 1894, **4**, 69); Tischutkin, Über Agar-Agarkulturen einiger Algen und Amöben (Zbl. f. Bakt. II, 1897, **3**, 183); Matruchot, L., und Molliard, M., Variations de structure d'une algue verte sous l'influence du milieu nutritif (Rev. gén. de Bot. 1902, **14**, 113); Artari s. o.; Charpentier, P. Q., Recherches sur la physiologie d'une algue verte (Ann. Inst. Pasteur 1903, **17**, 369); Alimentation azotée d'une algue: le *Cystococcus humicola* (ibid. 321); Radais s. o.; Grintzesco, J., Rech. expér. sur la morphol. et physiol. d. *Scenedesmus acutus* Meyen (Bull. Herb. Boissier 1902, 2. sér., **2**, 219); *Chlorella vulgaris* Beyer. (Rev. gén. Bot. 1903, **15**, 1). Weitere Literaturzitate z. B. bei Gerneck, Zur Kenntnis der niederen Chlorophyzeen (Beih. z. Bot. Zbl. II, 1907, **21**, 221).

2) Die Bedingungen der Fortpflanzung usw. Jena 1896, 175, 182ff.

3) Vgl. Benecke, W., und Keutner, J., Über stickstoffbindende Bakterien aus der Ostsee (Ber. d. D. Bot. Ges. 1903, **21**, 333); Keding, Weitere Untersuch. über stickstoffbindende Bakterien (Wissenschaftliche Meeresuntersuch. Abt. Kiel, N. F. 1906, **9**, 275).

fläche anzutreffen ist; manche Süßwasseralgen verhalten sich anscheinend ähnlich.[1])

Ob die von STROHMEYER[2]) ermittelten Beziehungen zwischen der Assimilationstätigkeit grüner (Süßwasser-)Algen und dem Keimgehalt des Wassers bei der Kultur grüner Algen nutzbringend gemacht werden können, ist meines Wissens noch nicht näher untersucht worden. STROHMEYER gibt an, daß grüne Algen das sie umgebende Wasser bei Belichtung völlig keimfrei machen können (*Enteromorpha* nach 22 Stunden, *Spirogyra* nach 30 usf.).

Beziehungen zum Sauerstoff. — Daß Algen lange Zeit ohne Sauerstoff auskommen und bei Zuckerernährung und O-Abschluß kräftige Gärung veranlassen können, ist für verschiedene Formen sicher gestellt. Die Beobachtungen von BEYERINCK (a. a. O.) über anaërobe Existenz künstlich gezüchteter Algen beziehen sich auf *Chlorosphaera limicola*, CHARPENTIER[3]) sah *Cystococcus* bei Glukoseernährung lebhaft gären, PALLADIN[4]) und PETRASCHEVSKY[5]) arbeiteten mit *Chlorothecium saccharophilum*. Angaben über anaërob lebende *Chlorella* und *Scenedesmus* bei GRINTZESCO (a. a. O.).

Giftwirkungen. — Giftwirkungen auf Algen, die über Leben und Tod der Zellen entscheiden oder charakteristische Veränderungen in der lebenden Zelle veranlassen, sind schon wiederholt beschrieben worden; die in Frage stehenden Mitteilungen haben wohl ihr toxikologisches Interesse, sind aber für die Lehre von der Kultur der Algen im allgemeinen belanglos. Um so wichtiger sind die seit NÄGELI[6]) oft wiederholten Beobachtungen über die Giftigkeit der Metallsalze, insbesondere des Kupfers. Die „oligodynamische" Wirkung des letzteren besteht darin, daß selbst sehr weitgehende Verdünnungen — 1 Teil Cu und 10 Millionen Teile Wasser — vermutlich nach allmählicher Speicherung des Giftstoffes in den Algenzellen diese töten. Besonders empfindlich sind die Spirogyren. Es ergibt sich daraus die Lehre, daß Wasser, welches aus kupfernen Kesseln destilliert worden ist oder längere Zeit in kupfernen Leitungsröhren gestanden hat, für *Spirogyra*kulturen u. dgl. nicht

---

1) REINKE, J., Symbiose von *Volvox* und *Azotobacter* (Ber. d. D. Bot. Ges. 1903, **21**, 481); über Oszillarien siehe später im Abschnitt „Bakterien".

2) STROHMEYER, O., Die Algenflora des Hamburger Wasserwerks. 1. Einfluß der Algen auf den Filtrationsvorgang. 2. Über den Einfluß einiger Grünalgen auf Wasserbakterien. Ein Beitrag zur Frage der Selbstreinigung der Flüsse. Leipzig 1897.

3) Rech. s. la physiol. d'une algue verte (Ann. Inst. Pasteur 1903, **17**, 369).

4) Über norm. u. intramolekulare Atmung d. einzell. Alge *Chl. sacch.* (Zbl. f. Bakt. II, 1903, **11**, 146).

5) Über Atmungskoëffizienten der einzelligen Alge *Chl. sacch.* (Ber. d. D. Bot. Ges. 1904, **22**, 323).

6) Über oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen (Denkschr. d. Schweiz. Naturforsch. Ges. 1893). Vgl. auch ISRAEL u. KLINGMANN, Oligodynamische Erschein. an pflanzl. u. tierischen Zellen (VIRCHOWS Arch. f. pathol. Anat. 1897, **147**, 143).

tauglich ist; die Beobachtung von MATRUCHOT und MOLLIARD[1]), daß *Stichococcus* durch Kupfersulfatlösung, deren Konzentration geringer ist als 0,0005 %, insofern gefördert wird, als er ganz besonders schwache Mineralsalzlösungen noch verarbeiten kann, verdient nähere Prüfung. An *Spirogyra* und *Mougeotia genuflexa* ruft Leuchtgas rhizoidenähnliche Auswüchse hervor; *Cladophora* bildet unter Einwirkung desselben Gases Aplanosporen oder Zysten.[2])

Physiologische Rassen, Mutation. — Die Lehre von der Pleomorphie oder dem Polymorphismus der niederen Algen, nach welcher ein und dieselbe Spezies bald als *Tetraspora*, bald als *Chlorococcum, Scenedesmus, Raphidium* usw. erscheinen kann (BORZI)[3]), darf nach den Ergebnissen der modernen, mit Reinkulturen arbeitenden Algenforschung als erledigt betrachtet werden. Ebenso sicher ist neben dem negativen das positive Ergebnis, daß viele Algenarten in mehreren physiologisch deutlich unterschiedenen Formen oder „Rassen" auftreten, und daß solche Rassen in Kulturen sozusagen vor unseren Augen entstehen und ineinander übergehen können. Die Unterschiede der Rassen einer Spezies liegen zunächst in ernährungsphysiologischen, hiernach aber auch in morphologischen und entwicklungsgeschichtlichen Merkmalen. Ein interessantes Beispiel für ernährungsphysiologisch unterschiedene Rassen sind die von BEYERINCK (a. a. O.) und ARTARI[4]) studierten Flechtengonidien von *Xanthoria, Physcia* u. dgl. und die entsprechenden freilebenden Algenformen. ARTARI operierte insbesondere mit freilebendem *Chlorococcum infusionum* und mit Vertretern derselben Art, die den Flechten entnommen waren: in Übereinstimmung mit BEYERINCKS Resultaten ließ sich zeigen, daß die Flechtengonidien Peptonorganismen sind, die freilebend aufgefangenen als Nitratorganismen kultiviert werden wollen. Merkwürdig ist, daß auch am nämlichen Standort ein und dieselbe Algenspezies in mehreren ernährungsphysiologisch verschiedenen Rassen angetroffen werden kann. ARTARI z. B. macht a. a. O. auf verschiedene Rassen von *Scenedesmus caudatus* aufmerksam, die sich ineinander überführen lassen. Weitere Beispiele sind bei KRÜGER und SCHNEIDEWIND, bei GERNECK u. a. zu finden.[5])

---

1) Variations de struct. d'une algue verte sous l'influence du milieu nutritif (Rev. gén. de Bot. 1902, **14**, 113).

2) WOYCICKI, Z., Beob. üb. Wachstums-, Regenerations- u. Propagationserscheinungen bei einigen fadenförmigen Chlorophyzeen in Labor.-Kulturen u. unt. d. Einfl. d. Leuchtgases (Bull. internat. de l'acad. sc. Cracovie 1909, Nr. 8, 588).

3) Literatur bei KLEBS a. a. O. 1896, 169ff.

4) Zur Frage der physiolog. Rassen einiger grünen Algen (Ber. d. D. Bot. Ges. 1902, **20**, 172).

5) KRÜGER u. SCHNEIDEWIND, Sind niedere chlorophyllgrüne Algen imstande, den freien Stickstoff der Atmosphäre zu assimilieren und den Boden an Stickstoff zu bereichern? (Landwirtsch. Jahrb. 1900, **29**, 771); GERNECK, Zur Kenntn. d. nied. Chlorophyzeen (Beih. z. Bot. Zbl. II, 1907, **21**, 221).

Eine weitere Gruppe von Rassen sind diejenigen, welche sich entwicklungsgeschichtlich voneinander unterscheiden; durch sie wird es erklärt, daß sich Vertreter der nämlichen Spezies bei künstlicher Kultur recht verschieden verhalten können. KLEBS unterscheidet (a. a. O. S. 157ff.) bei *Hydrodicyton* Netze mit starker und solche mit schwacher Neigung zur Zoosporenbildung; GERNECK (a. a. O. S. 235ff.) findet vier Rassen von *Chlorococcum infusionum*, die sich durch Zellen- und Schwärmergröße, Öl- und Fettgehalt und überdies durch ihr Verhalten zu BEYERINCKS und TOLLENSscher Nährlösung unterscheiden u. dgl. m.

Schließlich mag noch auf die von BEYERINCK aus Schlamm, Fäzes usw. isolierte sonderbare *Chlorella variegata*[1]) hingewiesen sein, die, auf festen Nährböden kultiviert, gleich einer panachierten Pflanze grüne neben farblosen Zellen entwickelt: die Alge bildet zunächst farblose Kolonien, die aber (auf Bierwürze) nach 2—3 Wochen grün werden; der Rand der Kolonien bleibt im allgemeinen farblos, in der Mitte ist die Kolonie grün, oder es treten grüne Sektoren oder unregelmäßige Gruppen auf.

Von degenerativer Rassenbildung kann man vielleicht dann sprechen, wenn z. B. unter dem Einfluß langer Züchtung die Organismen gewisse Eigenschaften verlieren. BEYERINCK gibt an, daß *Scenedesmus acutus* durch fortgesetzte Kultur seine Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, einbüßt.[2])

Formative Effekte. — Aufgabe der nachfolgenden Zeilen ist ausschließlich, auf die Möglichkeit, durch bestimmte Kulturbedingungen bestimmte Wachstums- und Gestaltungsprozesse an den Algen gesetzmäßig hervorrufen zu können, aufmerksam zu machen und diese besonders durch die Untersuchungen von KLEBS gewonnene Erkenntnis[3]) durch einige wenige Beispiele zu erläutern. — Besonders die Schwärmsporen- (Zoosporen-) und Gametenbildung ist nach entwicklungsmechanischen Gesichtspunkten hin oft untersucht worden. Im allgemeinen läßt sich sagen, daß Verdunkelung und Übertragen der Objekte in reines Wasser oder eine Nährlösung, deren Konzentration geringer ist als die des ursprünglichen Mediums, Zoosporenbildung veranlassen. Offenbar ist die Herabsetzung des osmotischen Zellsaftdruckes dabei von maßgebender Bedeutung.[4]) Über den Einfluß der chemischen Zusammensetzung des Nährmediums auf die Zoosporenbildung stellten außer KLEBS TH. FRANK und FREUND[5]) Untersuchungen an. — An *Oedogonium*

1) *Chlorella variegata*, ein bunter Mikrobe (Rec. trav. bot. Néerland. 1904, **1**, 14, vgl. Zbl. f. Bakt. II, 1905, **14**, 338).

2) Bericht über meine Kulturen niederer Algen auf Nährgelatine (Zbl. f. Bakt. 1893, **13**, 368).

3) Über die Beding. d. Fortpfl. usw. 1896, Üb. Probleme d. Entwickl. III (Biol. Zbl. 1904, **24**, 449).

4) KLEBS, 1904 a. a. O., 497ff.

5) FRANK, TH., Kultur u. chemische Reizerscheinungen der *Chlamydomonas tingens* (Bot. Ztg. 1904, **62**, 153); FREUND, H., Neue Vers. üb. d. Wirkungen d. Außenwelt auf d. ungeschl. Fortpfl. d. Algen (Flora 1907, **98**, 1; auch Dissertation Halle a. S., 1907).

treten bei Kultur in nährsalzarmer Lösung und bei kräftiger Belichtung Fortpflanzungsorgane auf; auch bei den Konjugaten ist die Bildung der geschlechtlichen Fortpflanzungszellen von der Belichtung abhängig (s. u.). — Über die Rhizoidbildung unter bestimmten äußeren Bedingungen (Kontakt mit festen Körpern, Kultur in Zuckerlösungen, giftige Gase u. a.) vgl. BORGE[1]) und WOYCICKI (s. o.). — Zerfall fadenförmiger Algen in einzelne Zellen als Folge bestimmter Kulturbedingungen studierten besonders KLEBS (a. a. O.), BENECKE[2]), GERNECK (a. a. O.); bei *Hormidium* z. B. tritt nach KLEBS bei Mangel an Nährsalzen sowie bei Mangel an Feuchtigkeit Zerfall ein. BENECKE zeigte, daß Turgorsteigerung die Fäden der Konjugaten zum Zerfall bringt. — Auf die Wuchsform — d. h. ob z. B. regelmäßige Fäden oder sogen. Palmellen entstehen, reich verzweigte Fäden oder schwach verzweigte usw. — sind Belichtung sowie Konzentration und Aggregatzustand des Nährmediums von Einfluß. — Über die Gallertbildung unter dem Einfluß äußerer Bedingungen vgl. GERNECK (a. a. O.), ebendort Angaben über „Involutionsformen", die in erschöpften Kulturen aufzutreten pflegen. — Auf einige weitere „formative Effekte" bestimmter Kulturbedingungen wird bei Besprechung der einzelnen Familien zu verweisen sein.

Zyanophyzeen. Unsere Kenntnis von den Lebens- und Kulturbedingungen der Zyanophyzeen ist sehr lückenhaft. Offenbar verhalten sich die verschiedenen Gruppen der Zyanophyzeen recht ungleich. Zyanophyzeenmaterial ist leicht zu beschaffen: in Gartenerde, Schlamm usw. sind sie überall verbreitet; auf feuchten Mauern und Steinen, außen an verwahrlosten Blumentöpfen, auf feuchter Erde sind sie anzutreffen. Oszillarien sind auf durchnäßtem sumpfigen Erdreich, an Inundationsgebieten usw.; auch auf feucht gehaltenem reinen Sand siedeln sich in Laboratorien und Gärten gern Nostokazeen und Oszillarien an. Die Angaben über Zyanophyzeenkulturen lauten noch recht widersprechend. MOLISCH (s. o.) kultivierte Oszillarien auf der gewöhnlichen Algennährlösung bei schwach alkalischer Reaktion, SCHLÖSING und LAURENT (s. u.) machten auf das geringe Bedürfnis der Algen an organischen Substanzen aufmerksam, ETARD und BOUILHAC kultivierten ein *Nostoc* auf Zuckerlösungen[3]) u. dgl. m. Systematische Kulturen mit verschiedenen Zyanophyzeen stellte hauptsächlich BEYERINCK an, welcher Nostokazeen und Chrookokkazeen zu den oligonitrophilen Organismen rechnet, d. h. zu denjenigen, welche ihr optimales Wachstum dann erreichen, wenn der Nährboden nur äußerst geringe Mengen N enthält, und welche den Stickstoff der Luft zu verarbeiten imstande sind[4]). BEYERINCK infiziert

1000 g Leitungswasser
0,02 „ K_2HPO_4

1) Üb. d. Rhizoidbildung bei einigen fadenförmigen Chlorophyzeen. Upsala 1894.

2) Mechanismus u. Biol. d. Zerfalls d. Konjugatenfäden in die einzelnen Zellen (Jahrb. f. wiss. Bot. 1898, **32**, 453).

3) Présence des chlorophylles dans un *Nostoc* cultivé à l'abri de la lumière (C. R. Acad. Sc. Paris 1898, **127**, 119).

4) Vgl. oben 109, Anm. 3. Siehe ferner SCHLÖSING fils und LAURENT, Fixation de l'azote libre par les plantes (Ann. Inst. Pasteur, 1892, **6**, 832); HEINZE, B., Einige Beitr. z. mikrobiol. Bodenkunde (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **16**, 640).

mit Gartenerde. Im Sommer entsteht nach 4—5 Wochen kräftige Zyanophyzeenvegetation. Oszillarien treten in ihr allerdings nicht auf, da sie größere Mengen gebundenen Stickstoffs beanspruchen. Als feste Nährböden sind Kieselgallerte und gereinigter Agar brauchbar, in die man 0,02 % K_2HPO_4 hineindiffundieren läßt. Nach v. Deldens Beobachtung beanspruchen Oszillarien ganz besonders gründlich gereinigten Agar, dem eine kleine Quantität Ammoniumnitrat zugefügt worden ist.[1])

Diatomeen (Bazillariazeen). Reinkulturen von beweglichen Formen gewinnt man dadurch, daß man das Ausgangsmaterial auf Agar aussät; die Diatomeen bewegen sich schnell vorwärts und lassen die ihnen zunächst noch anhaftenden Verunreinigungen bald hinter sich; am Rande ihres Verbreitungsbezirkes hebt man ein Stückchen Agar ab und überträgt es samt den darauf befindlichen Diatomeen auf eine neue Kulturplatte. In neuester Zeit hat sich O. Richter[2]) um die Erforschung der Diatomeen mit Hilfe künstlicher Züchtung sehr verdient gemacht. Wir folgen hier im wesentlichen seinen Angaben, — Diatomeen erfordern schwach alkalische Reaktion des Nährsubstrats; außer den üblichen Mineralbestandteilen lieben sie noch geringen Zusatz von Kieselsäure, die freilich dann, wenn man keine besonderen Vorsichtsmaßregeln anwendet, schon aus dem Glase der Gefäße in die Nährmedien gelangt. Marine Diatomeen beanspruchen auch Na. O. Richter empfiehlt

10 % Gelatine (bzw. 1,8 % Agar)		1000 Teile destill. Wasser
0,01 % $K_2Si_2O_5$		18 g Agar (auszuwaschen)
0,02 % $CaCl_2$	sowie	0,2 „ $CaCl_2$
		0,2 „ KNO_3
		0,05 „ $MgSO_4$
		0,01 „ $K_2Si_2O_5$
		Spur $FeSO_4$.

Übrigens enthält auch Gelatine an sich schon alle zur Ernährung der Diatomeen nötigen Stoffe und kann nach Neutralisation und Klärung direkt als Nährboden verwendet werden. Die Diatomeen scheiden ein proteolytisches, Gelatine verflüssigendes Enzym aus und können auch Agar verflüssigen. — Ihren N-Bedarf decken die Diatomeen nach O. Richter aus Ammoniumverbindungen und Nitraten; sehr geeignet sind ferner Asparagin und Leuzin, weniger Albumin und Pepton. Zusatz von Kohlehydraten fördert die Entwicklung der Diatomeen[3]), führt aber zur Rückbildung ihrer Chromatophoren. — Farblose Diatomeen (*Nitzschia putrida*) fordern selbstverständlich organische Nahrung; sehr gut wächst die genannte Spezies z. B. auf Meerwasseragar + Fucusdekokt. Legt man eine Probe von faulendem Tang auf geeigneten Agar, so wird man sehr bald von der Impfstelle aus sich Nitzschien verbreiten sehen; ausführliche Angaben über ihre Ernährungsphysiologie bei Richter a. a. O. 1909. — Ein der Diatomeenentwicklung sehr günstiges Licht erhielt Richter dadurch, daß er seine Kulturen unter Senebiersche, mit Leitungswasser gefüllte Glocken stellte.

---

1) Vgl. Beyerinck a. a. O. 566.

2) Reinkulturen v. D. (Ber. d. D. Bot. Ges. 1903, **21**, 493); Zur Physiol. d. D., I. Mitteilung (Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien 1906, **115**, I, 27). II. Mitteilung, Die Biol. d. *Nitzschia putrida* Benecke (Denkschr. Akad. Wiss. Wien 1909, **84**); vgl. ferner Meinhold, Th., Beitr. z. Phys. d. Diat. (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1911, **10**, 353).

3) Vgl. O. Richter a. a. O.; ferner Karsten, Üb. farblose Diatomeen (Flora 1901, **89**, 404); Benecke, Über farblose Diat. der Kieler Föhrde (Jahrb. f. wiss. Bot. 1900, **35**, 535).

Chlorophyzeen (einschl. **Konjugaten**). — Bei ihrer Formenmannigfaltigkeit, ihrer weiten Verbreitung und ihrer Anpassungsfähigkeit an die verschiedensten künstlichen Substrate sind sie von allen Algengruppen hinsichtlich ihrer Ernährungsphysiologie und Kultivierbarkeit am besten erforscht, und viele der Angaben, die ich oben zusammengestellt habe, sind bisher nur an Grünalgen gewonnen worden und in erster Linie auf diese zu beziehen. Ich verweise daher auf das oben über anorganische und organische Ernährung, über Rassenbildung usw. Gesagte. — Die ausführlichsten Untersuchungen verdanken wir BEYERINCK (a. a. O.) und KLEBS (a. a. O. 1896), seinen Schülern ARTARI, SENN[1]), FREUND, ferner TH. FRANK, GERNECK, sowie den schon genannten französischen Forschern. Reinkulturen, die auch von Bakterien frei sind, liegen z. B. für Chlamydomonaden, Protokokkazeen und Hormidiumformen vor; bei den übrigen handelt es sich um „Reinkulturen", die außer der zur Untersuchung gewählten Alge wenigstens keine andere Algenspezies enthielten.

Chlamydomonaden sind besonders von KLEBS und TH. FRANK, ARTARI[2]), OGATA[3]) und JACOBSEN kultiviert worden. Vertreter der Gruppe sind in Tümpeln und Gräben weit verbreitet und können, wie JACOBSEN gezeigt hat, auch aus Gartenerde leicht gewonnen werden. Man fülle, um reichliche Vegetationen zu erhalten, Bechergläser mit je 1 l Wasser und gebe 3 g Fibrin (MERCK) und ca. 300 g Erde zu; nach 10 Tagen sind in den Kulturen *Chlorogonium euchlorium, Sphondylomorium quaternarium, Chlamydomonas variabilis, Polytoma uvella* a. u. reichlich zu finden. Bei Verwendung kleinerer Gläser und kleinerer Becher oder Schlammproben schüttete JACOBSEN noch eine ca. 2—3 cm hohe Schicht pasteurisierter (d. h. mit siedendem Wasser übergossener) Gartenerde hinzu; auf diese Weise blieben die Chlamydomonaden vor der störenden Einwirkung der Fäulnisbakterien bewahrt.[4]) — Zur Herstellung einer anorganischen Nährflüssigkeit löst JACOBSEN in Wasser

NH_4NO_3	0,02 %
K_2HPO_4	0,02 %
$MgSO_4$	0,01 %
Gewäss. Agar	1,5 %.

Chlorogonium euchlorium, Chlamydomonas Ehrenbergi, Chl. intermedia wachsen bei autotropher Lebensweise gut oder ziemlich gut, *Chl. variabilis* und *Sphondylomorium quaternarium* schwach, *Carteria ovata* und *Polytoma uvella* gar nicht; mixotroph wachsen alle genannten Arten gut, heterotroph (im Dunklen) bleiben alle hinter *Polytoma* zurück. Letztere kultivierte JACOBSEN in

Pepton (WITTE) . . .	1 %
K_2HPO_4	0,02 %
Agar	1,5 %.

Noch besser gedeiht *Polytoma* auf einem Agar, den man auf folgende Weise gewinnt: zu 450 ccm Leitungswasser werden 2 g Fibrin und 50 g Erde zugesetzt; dieses Gemisch läßt man im Brutschrank bei 35° C faulen; die stinkende Flüssigkeit wird dann abfiltriert, sterilisiert und zu Agar (1,5 %) verarbeitet (Plattenkulturen).

---

1) Über einige koloniebildende einzellige Algen (Bot. Zeitg. I, 1899, **52**, 39).

2) Untersuch. üb. Entwickl. u. System. einiger Protokokkazeen (Bull. Soc. imp. Natur., Moscou 1892; auch Dissertation Basel 1892).

3) Über die Reinkulturen gewisser Protozoën (Infusorien) (Zbl. f. Bakt. 1893, **14**, 165).

4) JACOBSEN, H. C., Kulturversuche mit einigen niederen Volvokazeen (Zeitschr. f. Bot. 1910, **2**, 145).

Zur Anreicherung seiner Kulturen an Volvokazeen, darunter auch an *Carteria ovata*, bediente sich JACOBSEN ferner noch folgender Lösung:

Leitungswasser . . .	100	g
Kalziumazetat . . .	2	„
K_2HPO_4	0,05	„
NH_4Cl	0,05	„.

Auch die Ca-Salze der Propion-, Butter-, Milch- und Apfelsäure gaben bei Kultur der *Carteria* gute Resultate.

Über Protokokkazeen stellten namentlich BEYERINCK und ARTARI Untersuchungen an[1]: das *Chlorococcum infusionum* gehört zu den Bewohnern unserer Tümpel, tritt spontan in Aquarien usw. auf und läßt sich leicht in den üblichen Nährlösungen kultivieren, über Rassen vgl. GERNECK (a. a. O.); *Pleurococcus vulgaris*, eine schnellwachsende Alge, die auf Zäunen, Dächern, Mauern, Bäumen grüne Anflüge bildet und nach BEYERINCK unmittelbar nach der Isolierung aus der Natur gut ausgewaschenen Agar beansprucht[2]; *P. Beyerinckii* ARTARI (*Chlorella vulgaris* BEYERINCK) wurde von BEYERINCK[3]) und ARTARI kultiviert; über *Chlorella variegata* s. o. Über *Gloeocystis*, *Dactylococcus* und *Chlorosphaera* vgl. ARTARI (a. a. O.), über *Chlorotheca* besonders KRÜGER (a. a. O.), über *Scenedesmus* BEYERINCK, ARTARI, SENN, über *Eremosphaera* MOORE[4]), über *Apiocytium*, *Chlorotetras*, *Chlorosarcina*, *Stichococcus* und viele bereits genannte Gattungen vgl. GERNECK (a. a. O.) usf. Über Algen aus Flechten („Gonidien") und aus *Hydra viridis* siehe BEYERINCK und ARTARI. — Über *Hydrodictyon* — Kulturbedingungen, Schwärmsporen- und Gametenbildung — vgl. KLEBS.

Coelastrum microporum mag als torfbewohnende, kalkfeindliche Alge genannt sein. SENN kultivierte sie in kalkfreier KNOPscher und besonders in OEHLMANNS Ca-freier Lösung[5]):

Magnesiumsulfat	2	g
Mononatriumphosphat . .	4	„
Kalisalpeter	4	„
Destilliertes Wasser	990	„

Die so gewonnene 1 %ige Lösung wird auf 0,1 oder 0,2 % verdünnt.

Microthamnion Kützingianum tritt spontan hier und da in Laboratorien auf und ist leicht zu kultivieren (vgl. MOLISCH)[6]); über *Conferva*, verschiedene Ulotrichazeen, *Oedogonium* und *Stigeoclonium* vgl. besonders KLEBS (a. a. O.), ebendort Angaben über *Vaucheria* und *Botrydium*.

---

1) Außer der oben zitierten Dissertation vgl. auch die oben genannten Arbeiten ARTARIS und die 112 zusammengestellten Arbeiten anderer Autoren.

2) Notiz über *Pl. vulgaris* (Zbl. f. Bakt. II, 1898, **4**, 785).

3) Bericht üb. meine Kulturen nied. Algen auf Nährgelatine (ibid. 1893, **13**, 368); eine *Chlorella* bildet die Hauptmasse der sogen. „PRIESTLEYschen Materie" und hat einiges Interesse für die Geschichte des Dogmas der generatio aequivoca (BEYERINCK a. a. O. 1898).

4) *Eremosphaera viridis* and *Excentrosphaera* (Bot. Gaz. 1901, **32**, 309).

5) Vegetative Fortpflanzung der Sphagnazeen nebst ihrem Verhalten gegen Kalk. Braunschweig 1898 (Baseler Dissertation).

6) Die Ernährung der Algen (Süßwasseralgen I.) a. a. O.

Die Konjugaten sind gegen Kultur im Laboratorium meist recht empfindlich. In Leitungswasser kann man an sonnenfreien Standorten Spirogyren monatelang und jahrelang lebendig und in Wachstum erhalten, vorausgesetzt, daß keine oligodynamischen Giftwirkungen die Kultur vernichten. Schon NÄGELI stellte fest, daß die kleinen Formen (*varians, longata, Weberi* u. a.) relativ widerstandsfähig sind.

Spirogyren lassen sich im Zimmer bei Kultur in verdünnten Nährlösungen z. B. von folgender Zusammensetzung halten:

NH_4NO_3	0,01 %
$CaCl_2$	0,005 %
K_2HPO_4	0,005 %
$MgSO_4 + 7H_2O$	0,005 %
Fe_2Cl_3	1 Tropfen der offiz. Lösung auf 1500 ccm Nährlösung.

Kopulation tritt bei Verwendung N-haltiger Nährlösungen nicht ein, wohl aber, wenn man die Algen in Wasser oder N-freie Lösungen überträgt[1]), man vergleiche auch die Angaben von KLEBS über Kopulation der Spirogyren in Kultur. Diesem Autor gelang es, Spirogyren sogar auf Agar zu kultivieren.

Für die Desmidiazeen gelten ähnliche Vorschriften. KLEBS konnte namentlich *Cosmarium botrytis* in Wassergefäßen über Lehm an kühlen Plätzen des Laboratoriums lange in Entwicklung erhalten. Besonnung regt Kopulation an, die auch durch Zusatz von Zuckerlösung (2—4 % Maltose oder Saccharose) befördert wird. In Objektträgerkulturen wurden verschiedene Desmidiazeen (*Hyalotheca, Cosmarium, Closterium, Euastrum*) von ANDREESEN beobachtet[2]); Ernährung mit Amidostickstoff (Asparagin 0,1—1 %, Leuzin 0,5 %) erwies sich als sehr förderlich. *Cosmarium* wurde auch auf Agar kultiviert und bildete auf diesem lange Ketten; *Closterium* zerbricht auf Agar bei der Teilung — wohl infolge der Reibung der Zelle an der Agaroberfläche. Generationsdauer bei optimalen Kulturbedingungen ca. 48 Stunden.

Rhodophyzeen. Mit der einzelligen Rotalge *Porphyridium* stellte ARTARI (a. a. O.) einige Kulturen auf Torf und Lehm an; Lösungen sind nach diesem Autor minder geeignet.

Die Methoden, welche bei der Kultur umfänglicher mariner Rot- und Braunalgen angewandt worden sind[3]), dürfen deswegen hier nicht ganz unerwähnt bleiben, weil eben diese Methoden auch bei der Beschäftigung mit marinen Mikroorganismen wertvoll werden können.

Da für viele Kulturzwecke sich Meerwasser nicht als salzreich genug erweist, haben ALLEN und NILSON, DREWS und KILLIAN neuerdings das natürliche Wasser durch Zusatz von Salzlösungen geeigneter zu machen versucht. DREWS und KILLIAN kultivierten Rotalgen und Braunalgen in filtriertem Seewasser (BERKEFELD-Filter), zu welchem pro Liter 2 ccm von Lösung A und 1 ccm von Lösung B zugesetzt worden waren[4]):

---

1) BENECKE, W., Üb. d. Ursachen d. Periodizität im Auftreten der Algen usw. (Internat. Rev. ges. Hydrobiol. 1908, **1**, 533).

2) ANDREESEN, A., Beitr. z. Kenntn. d. Phys. d. D. (Flora 1909, **99**, 373). PRINGSHEIM, E. G., Kulturvers. m. Chlorophyllfüla. (Mikroorg. I. Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1912, **11**, 305).

3) Vgl. OLTMANNS, Morph. u. Biol. d. Algen 1905, **2**, 385.

4) KILLIAN, Beitr. z. Kenntn. d. Laminarien (Zeitschr. f. Bot. 1911, **3**, 433); dort weitere Literaturangaben.

$NaNO_3$	2 g	Na_2HPO_4	4 g
KNO_3	2 „	$CaCl_2$	4 „
NH_4NO_3	1 „	$FeCl_3$ cryst. pur.	2 „
Aqua dest.	100 „	HCl conc.	2 „
		Aq. dest.	80 „

Um auf Objektträgern, die in das Kulturwasser versenkt worden sind, Algenkeimlingen Ansiedlung und normale Entwicklung zu ermöglichen, behandelt SAUVAGEAU die Glasplatten mit Flußsäure, damit sie rauh werden.[1])

5. Pilze.

Pilze, mit welchen der Anfänger seine ersten Versuche machen kann, erhält man ohne weiteres, indem man angefeuchtetes Weißbrot, zuckerreiche Früchte oder dgl. im Laboratorium der Luftinfektion aussetzt. Dabei finden sich stets einige Mucorarten und Penizillien ein. Zahlreiche weitere leicht kultivierbare Pilze erhält man, wenn man welke Blätter, frischen Pferdemist u. ähnl. unter einer Glasglocke sich selbst überläßt.

Lebensweise der Pilze. — Die Pilze leben saprophytisch oder parasitisch, d. h. sie beziehen an ihren natürlichen Standorten ihren Bedarf an organischen Stoffen von organischen, toten oder lebenden Substraten. Von den als Parasiten, insbesondere als Pflanzenparasiten lebenden Pilzen können zurzeit erst einige und auch diese nur in einigen Stadien ihrer Entwicklung auf totem Material kultiviert werden. Für die künstliche Züchtung auf toten Substraten kommen somit in erster Linie die saprophytisch lebenden Pilze in Betracht; für die übrigen ist aber die Hoffnung nicht aufzugeben, daß auch ihre Kultur auf toten Substraten später gelingen wird: wenn zahlreiche Pilze in der Natur stets nur auf lebendigem Substrat vorkommen, so ist das Wesentliche dabei offenbar nicht die Vitalität ihres Nährbodens, sondern der Umstand, daß für die Entwicklung jener Pilze uns unbekannte Stoffe erforderlich sind, die in der Natur nur in lebenden Organismen und noch dazu nur in den Geweben bestimmter Gattungen vorkommen. Es spricht nichts gegen die Annahme, daß es später gelingen wird, diese Stoffe zu gewinnen und den Pilzen darzubieten und damit ihre künstliche Kultur einzuleiten.

Aschenbestandteile. — Pilze beanspruchen S, P, K und Mg, — Ca ist für viele Pilze überflüssig; MOLISCH und BENECKE haben hierüber Untersuchungen angestellt.[2]) Die Verwendbarkeit verschiedener P-Verbindungen hat DOX geprüft.[3]) Ob das Eisen wirklich völlig entbehrlich ist, oder ob

1) SAUVAGEAU (C. R. Soc. Biol. Paris 1908, **64**, 700).

2) MOLISCH, s. u. 125, Anm. 1, BENECKE, Die z. Ernähr. d. Schimmelp. notwend. Metalle (Jahrb. f. wiss. Bot. 1895, **28**, 487; auch Ber. d. D. Bot. Ges. 1894, [105]), Bedeut. d. K. u. Mg. f. Entwickl. u. Wachst. d. *Asperg.* usw. (Bot. Ztg. 1896, **54**, 97), ferner GÜNTHER, E., Beitr. z. mineral. Nahrung d. Pilze, Dissertation Erlangen 1897. Vgl. auch HORI, S., Haben die höheren Pilze Kalk nötig? (Flora 1910, **101**, 447; *Fusarium roseum* u. a. gedeihen nicht ohne Ca) und WEIR, J. R., Benötigt der Pilz *Coprinus* Kalksalze usw. (ibid. 1911, **103**, 87).

3) DOX, A. W., Phosph. assim. of *Asperg. nig.* (Journ. biol. chem. 1911; vgl. Bull. Inst. Pasteur 1912, **10**, 77).

die geringen Quantitäten, die als Verunreinigungen beim Anfertigen einer Nährlösung nicht auszuschließen sind, genügen, um das Eisenbedürfnis der Pilze zu decken, mag dahingestellt bleiben. Sind die genannten notwendigen Substanzen nur in allzu geringen Dosen vorhanden, so kann zwar Wachstum und spärliche Myzelbildung eintreten, aber die Sporenbildung bleibt aus. SCHOSTAKOWITSCH z. B. sah, daß *Fumago* in Peptonlösung ein dürftiges steriles Myzel bildete; wurden die nötigen Salze hinzugefügt, so trat reichliche Sporenbildung ein; wurde von K, Mg und P ein Element dem Pilz nicht geboten, so bildeten sich wohl Konidienträger, aber keine reifen Konidien. Auch andere Beobachtungen zeigen, daß für die Sporenbildung größere Mengen von Aschenbestandteilen erforderlich sind als für die Bildung vegetativen Myzels. Die Abhängigkeit der Sporenbildung bei *Aspergillus* von den gebotenen Aschenbestandteilen ist neuerdings von französischen Autoren wiederholt geprüft worden.[1]) — Ich begnüge mich mit dem Hinweis auf BERTRANDs Untersuchungen, nach welchen bei Gegenwart von Zn (s. u.) und Fe (1 : 100 000) *Aspergillus* keine Sporen bildet; Sporenbildung tritt aber ein, wenn gleichzeitig Mn zugefügt wird. — Ob die einzelnen zur Pilzentwicklung notwendigen Stoffe auf bestimmte Wachstumsvorgänge spezifischen Einfluß haben, und ob sich durch Mangel an dieser oder jener Substanz spezifische Bildungsabweichungen erzielen lassen, bedarf noch weiterer Erforschung; Mangel an K veranlaßt nach MOLLIARD und COUPIN[2]) bei der Konidienbildung von *Aspergillus niger* teratologische Bildungen u. dgl. m. Über die Einwirkung von K und Mg auf die Keimung vgl. unten p. 132; nach KOSSOWICZ hat Mg besonderen Einfluß auf die Pigmentbildung der Hefen.[3])

Bei der Anfertigung einer Nährlösung genügt die Beigabe von ca. 0,2 % Magnesiumsulfat und Kaliumphosphat, um alle Bedürfnisse der Pilze an Aschenbestandteilen zu decken. BREFELD[4]) setzt zur Nährlösung 0,25—0,5 % Zigarrenasche zu.

Kohlenstoffernährung. — Ein Universalrezept für Pilznährlösungen gibt es nicht, da die Ansprüche der Pilze hinsichtlich der C- und N-Quellen zu weit auseinander gehen. Zu den im folgenden gegebenen Bemerkungen vergleiche man auch das im Allgemeinen Teil (S. 19ff.) Gesagte.

Was zunächst die Kohlenstoffernährung betrifft, so kommt Kohlensäure für Pilze, soweit bisher bekannt, niemals in Betracht; vielmehr sind stets organische C-Verbindungen erforderlich. An erster Stelle zu nennen sind die

1) BERTRAND, G., Sur le rôle capital du manganèse dans la formation des conidies de l'*Aspergillus niger* (C. R. Acad. Sc. Paris 1912, **154**, 381; dort weitere Literaturzitate). Die abweichenden Angaben anderer Autoren führt B. auf die Verwendung unreinen Materials zurück.

2) Sur les formes tératol. du *Sterigmatocystis nigra* privé de potassium (C. R. Acad. Sc. Paris 1903, **136**, 1695).

3) Unters. üb. d. Verhalten der H. in mineral. Nährlösung (Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen Österreichs 1903, **6**, 27).

4) Meth. z. Unters. der Pilze (Landwirtsch. Jahrb. 1875, **4**, 151, 163).

Kohlehydrate (Zuckerarten); mit 2—3 oder mehr Prozent Trauben- oder Rohrzucker[1]) wird man selten fehlgreifen, neben den genannten sind aber auch bald diese, bald jene anderen Zuckerarten — Mono-, Di- und Trisaccharide — hervorragend brauchbar. Von Polysacchariden kommen z. B. Inulin, Glykogen, Dextrin in Betracht, von wasserunlöslichen Stärke und Zellulose; jene wird als Kleister oder auch in Form fester Körner dem Pilz dargeboten; für Zellulose erbrachte ITERSON[2]) den Beweis, daß Filtrierpapier gerade dann, wenn es nur mit anorganischen Nährlösungen (s. o. S. 17) getränkt ist, für viele Pilze einen besseren Nährboden abgibt als Zuckerlösungen. Nächst den Kohlehydraten kommen die mehrwertigen Alkohole in Betracht; man versuche z. B. auf 5—10 % Glyzerin oder Mannit die Pilze zu kultivieren; auch Sorbit, Erythrit usw. sind manchmal tauglich. Von den aliphatischen Säuren kommen etwa Apfelsäure, Zitronensäure, Weinsäure u. a. und die Alkalisalze dieser Säuren als gute C-Quellen in Betracht; sehr viel geringere Bedeutung kommt den aromatischen Säuren zu (z. B. Chinasäure), auf welchen nur einzelne Pilzsorten gut wachsen.[3]) — Will man Fette als Kohlenstoffnahrung verabfolgen, so fertige man nach R. H. SCHMIDT[4]) folgende Nährlösung an:

Kaliumnitrat	0,25 g
Magnesiumsulfat . . .	0,25 „
Kalziumnitrat	1,00 „
Monokaliumphosphat .	0,25 „
Ammoniumnitrat . . .	0,50 „
Destilliertes Wasser . .	1 l

und gebe auf je 100 ccm Lösung 1 g Mandelöl.

Manche Pilze kommen sogar mit Paraffin als C-Quelle aus.[5])

Weitere kohlenstoffliefernde Verbindungen sind die organischen N-Verbindungen, auf die sogleich einzugehen sein wird.

---

1) Es gibt übrigens weit verbreitete Schimmelpilze, welche Rohrzucker nicht invertieren und verarbeiten können (*Mucor mucedo, M. stolonifer* u. a.).

2) Die Zersetzung der Zellulose durch aërobe Mikroorganismen (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **11**, 689).

3) Vgl. z. B. DIAKONOW, Intramol. Atmung u. Gärtätigk. d. Schimmelpilze (Ber. d. D. Bot. Ges. 1886, **4**, 2).

4) Aufnahme und Verarbeitung von fetten Ölen durch Pflanzen (Flora 1891, **72**, 300). Vgl. auch BACHMANN, Einfluß der äußeren Bedingungen auf die Sporenbildung von *Thamnidium elegans* LINK (Bot. Zeitg. 1895, **53**, I, 107); BIFFEN, A fat destroying fungus (Ann. of Bot. 1899, **13**, 363; bezieht sich auf einen perithezienbildenden Pilz); RAHN, O., Die Zersetzung d. Fette (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **15**, 53, 422); ROUSSY, A., Sur la vie des champ. en milieu gras (C. R. Acad. Sc. Paris 1909, **149**, 482); OHTA, K., Üb. die fettzehrenden Wirkungen d. Schimmelp. usw. (Biochem. Zeitschr. 1911, **31**, 177); STADEL, O., Über einen neuen Pilz *Cunninghamella Bertholletiae* Diss. Kiel 1911 u. a. m.

5) Vgl. RAHN, O., Ein Paraffin zersetzender Schimmelpilz (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **16**, 382).

Stickstoffernährung. — Die Zahl der Pilze, welche elementaren N zu assimilieren befähigt sind, ist keineswegs gering; eine Reihe von Arbeiten, die in den letzten Jahren erschienen sind, lassen hieran nicht zweifeln. Nach STAHEL[1]) wachsen verschiedene Pilze (*Hormodendron cladosporioides, Bispora moniliodes, Macrosporium commune, Alternaria tenuis, Graphium penicillioides var. Ungeri*) auf Kieselgallertnährböden:

KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4$	0,2 „
Dextrose	50 „
$FeSO_4$	Spuren
NaCl	„
Wasser	1 l

deren N-Gehalt ungefähr 0,0001 % betrug. Eine weitere Reihe von Pilzen wachsen nach STAHEL auf den genannten Substanzen und auf Agar (1,5 %), dessen N-Gehalt 0,025 % betrug.

Die Befähigung zur N-Assimilation konnte durch Analysen für *Penicillium glaucum, Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Macrosporium commune, Alternaria tenuis* u. a. nachgewiesen werden.[2])

Bei der Kultur der auf N-Verbindungen angewiesenen Pilze kommen in erster Linie Nitrate und Ammoniakverbindungen als N-Quelle in Betracht[3]): *Mucor racemosus, Cladosporium herbarum* u. a. assimilieren Nitrat-N sehr leicht und bevorzugen ihn; *Aspergillus niger, Botrytis cinerea* und *Penicillium*-Arten wachsen auch auf Ammoniumverbindungen sehr gut oder sogar besser als auf Nitraten; *Rhizopus nigricans, Mucor mucedo* und *Thamnidium elegans* lehnen Nitrate ab.

Nitrite sind nicht so giftig, wie man lange meinte; es sind bereits mehrere Pilze bekannt geworden, die aus Nitriten ihren N-Bedarf entnehmen. RACIBORSKI fing nitritassimilierende Pilze mit Hilfe der elektiven Methode, indem er Lösungen von 5 % Saccharose und 2 % Natriumnitrit der Luftinfektion aussetzte.[4])

Ammoniaksalze sind für viele Pilze eine ideale Stickstoffnahrung. — Man nehme ca. ½ % Ammoniumnitrat, Ammoniumsulfat oder Ammonium-

1) STAHEL, G., Stickstoffbindung durch Pilze bei gleichzeitiger Ernährung mit gebundenem Stickstoff (Jahrb. f. wiss. Bot. 1911, **49**, 579).

2) Vgl. auch TERNETZ, CH., Üb. d. Assim. der atmosph. N. durch Pilze (Jahrb. f. wiss. Bot. 1907, **44**, 353), FRÖHLICH, H., Stickstoffbindung durch einige auf abgestorbenen Pfl. häufige Hyphomyc. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1908, **45**, 256), LIPMAN, CH. B., Nitrogen fixation by yeasts and other fungi (Journ. biol. chem. 1911, **10**, 169).

3) LAURENT, E., Rech. s. la valeur comparée des nitrates et des sels ammoniacaux comme aliment de la levure etc. (Ann. Inst. Pasteur 1889, **3**, 362), RITTER, G., Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle f. Schimmelpilze (Ber. d. D. Bot. Ges. 1909, **27**, 582).

4) RACIBORSKI, Über die Assimilation der Stickstoffverbindungen durch Pilze (Bull. Acad. Sc. Cracovie Oct. 1906, 733); vgl. auch LAURENT a. a. O., WINOGRADSKI und OMELIANSKI, Über d. Einflüsse organischer Nährstoffe auf d. Arbeit d. nitrifiz. Mikroben (Zbl. f. Bakt. II, 1899, **5**, 329) und oben 21, Anm. 5.

phosphat. Nach RITTER (s. o.) wird Ammonium aus seinen Mineralsalzen desto besser aufgenommen, je schwächer die frei werdende Säure ist (Ammoniumchlorid, -sulfat, -phosphat). Wählt man organische Ammoniumsalze, so wird im allgemeinen die sonst erforderliche Zugabe von Kohlehydraten oder dgl. überflüssig, da weinsaures, essigsaures, apfelsaures Ammonium auch C zu liefern vermögen. MOLISCH[1]) z. B. ernährte Pilze mit 2 % essigsaurem Ammoniak. Die ungleiche Nährwirkung der verschiedenen Ammoniaksalze hängt, wie CZAPEK zeigte[2]), von der elektrolytischen Dissoziation und vom Nährwert des Anions ab.

Von dem Nährwert der Amidoverbindungen, der Albumosen, Peptone usw., die für viele Pilze gleichzeitig als C- und N-Quellen wirken können, gilt das oben S. 22 Gesagte. Sie alle, wie Asparagin, Leuzin, Pepton, gehören zu den besten Pilznährstoffen. Auch Somatose (ca. 2 %) u. ähnl. sind geeignet.

Nährböden, Form der Kulturen. — Pilze lassen sich auf flüssigen wie auf festen Substraten gleich gut kultivieren. Unentbehrlich für die Praxis der Pilzzüchtung sind neben den organischen Nährlösungen von bekannter Zusammensetzung allerhand Extrakte, wie Pflaumensaft, Datteldekokt, Bierwürze, Malzextrakt, Honig, Himbeersaft, Dekokte von Erbsen oder Maiskörnern, Dekokte von Holz, Rinden, Früchten. Ebenso wie die Lösungen von bekannter Zusammensetzung wenden wir auch diese als flüssiges Nährsubstrat an oder verarbeiten sie mit Gelatine und Agar, oder tränken mit ihnen Weißbrot, reinen Sand u. a. m.; auch nährlösungdurchtränkte Schwämme wurden zur Pilzkultur empfohlen[3]). Von festen Nährböden kommen weiterhin namentlich Obst und sterilisierter Pferde- und Wildmist in Betracht, ferner Eier, Mohrrüben, Kartoffeln, Filtrierpapier, Pappe, Malz, Holz, kleine Zweigstücke usw. usw.

Beliebte Formen, die man Pilzkulturen geben kann, sind Reagensglas- und Petrischalenkulturen; weiterhin bedient man sich mit Vorteil irgendwelcher Deckeldosen verschiedenen Formats, der ERLENMEYER-Kolben usw.; Keimungen, Verhalten kleiner Pilzindividuen u. dgl. beobachtet man in der feuchten Kammer. Von der Form der letzteren, welche BREFELD bevorzugte, war oben (S. 53) die Rede.

---

1) Die mineral. Nahrung d. nied. Pilze (I. Abhandl.) (Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturw. Kl. I, 1894, 103, 554).

2) Biochemie d. Pfl. 2, 105: „So wirken die wenig dissoziierten Ammoniaksalze der Essigsäurereihe, deren Ammon überdies geringe Nährwirkung besitzt, bei *Aspergillus* sehr schlecht. Das gleiche gilt von jenen anorganischen Ammoniaksalzen, die sehr stark dissoziiert sind, wo aber nur die NH_4-Ionen verarbeitet werden, hingegen Anionen, welche schon in starker Verdünnung schädlich wirken (Cl, in mäßigem Grade auch SO_4), unbenutzt zurückbleiben."

3) FALCK, Beding. u. Bedeut. d. Zygotenbild. bei *Sporod. grandis* (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1901, 8, 213).

Auf flüssigen Medien bilden die Pilze entweder mehr oder minder feste „Decken", die manchmal hart und fest wie Leder oder Horn werden können, — oder sie wachsen submers und bilden zarte flutende Flocken oder schwebende kugelähnliche Aggregate. Übrigens bestehen selbst in relativ jungen Kulturen die Myzelmassen keineswegs aus lauter lebendigen Zellen: die Myzelzellen von *Aspergillus niger* leben nach Köhler bei Kultur auf Nährlösungen im allgemeinen nur 4—5 Tage; Unterdrückung der Sporenbildung hat keinen lebenverlängernden Einfluß.[1]) Diese Tatsachen sind zu berücksichtigen, wenn man die Herkunft der in gebrauchten Pilznährlösungen auftretenden Stoffe zu beurteilen hat (s. o. S. 81 und weiter unten „Stoffwechselprodukte").

Im allgemeinen wachsen Pilze auf reichlich gebotenem Nährsubstrat besser als auf spärlich vorhandenem, doch sind auch Beispiele für das Gegenteil bekannt.[2]) Wehmer meint, daß die Größe, in der die Kulturen angelegt werden, auf die Gestaltungsvorgänge mitbestimmend wirken kann[3]); so bringt der genannte Autor die bei *Penicillium luteum* besonders kräftig gebildeten Koremien mit der Größe des Kulturgefäßes in Zusammenhang und die fruchtähnlichen Bildungen von *Citromyces*-decken mit der Größe der Gärungsbottiche, in welchen sie auftreten. Beobachtungen dieser und ähnlicher Art verdienen weitere Prüfung; vielleicht liegen Erscheinungen vor, die mit der Wirkung wachstumhemmender oder wachstumfördernder Stoffwechselprodukte zusammenhängen.

Die Untersuchungen über den Festigkeitsgrad des Nährbodens und seinen Wassergehalt, die optimales Pilzwachstum gestatten, sind nur gelegentlich angestellt worden. Falck z. B. (a. a. O.) gibt an, daß *Sporodinia grandis* selbst auf 70 %iger Gelatine ihr Wachstum noch fortsetzt.

Aussaat. Ob man bei der Anlage einer neuen Kultur von einer Spore oder einem Myzelflöckchen ausgeht, ist in vieler Beziehung und bei vielen Pilzen keineswegs gleichgültig für die Entwicklung der Tochterkultur. Appel und Wollenweber geben an, daß *Fusarium*-Kulturen, die aus einer Spore erzogen worden sind, erheblich früher zur Konidienbildung kommen, als die durch Übertragen einer Myzelflocke gewonnenen.[4])

1) Köhler, P., Beitr. z. Kenntn. d. Reproduktions- u. Regenerationsvorgänge bei Pilzen u. d. Beding. des Absterbens myzelialer Zellen von *A. niger* (Flora 1907, **97**, 216); vgl. auch Pantanelli, Zur Kenntn. d. Turgorregulationen bei Schimmelpilzen (Jahrb. f. wiss. Bot. 1904, **40**, 303) und Munk, M., Die Hexenringbildung bei Schimmelpilzen (Zbl. f. Bakt. II, 1912, **32**, 353); 14 Tage alte Hyphen von *Hypocrea rufa* fand M. bereits abgestorben.

2) Vgl. Bachmann, J., *Mortierella van Tieghemi* (Jahrb. f. wiss. Bot. 1899, **34**, 279).

3) Kleinere mykol. Mitteil. (Zbl. f. Bakt. II, 1897, **3**, 149).

4) Appel, O., u. Wollenweber, H., Die Kultur als Grundlage zur besseren Unterscheidung systematisch schwieriger Hyphomyzeten (Ber. d. D. Bot. Ges. 1910, **28**, 435). Den strikten Nachweis, daß auch sehr kleine Myzelstücke und sogar einzelne Zellen des Myzels, auch Sporengienträger (*Phycomyces*) und Konidienträger (*Aspergillus, Penicillium*) zur Reproduktion genügen, hat P. Köhler erbracht (a. a. O.).

Was die Masse des ausgesäten Materials betrifft, so erhält man zuweilen verschiedene Resultate, je nachdem man einzelne Zellen oder reichliche Mengen von solchen aussät. Über „quantitative“ Aussaat vgl. auch das im Allgemeinen Teil (S. 63) Gesagte. Bereits BREFELD[1]) erkannte, daß Alkoholhefen in Objektträgerkulturen sich anders als in „Massenkulturen“ verhalten, und die Erscheinung der Gärung nur in letzteren sich studieren läßt. Die modernen Untersuchungen bestätigen derartige Erfahrungen (s. u. „Stoffwechselprodukte“). Die große Bedeutung der Einzellkultur, für die zuerst BREFELD eintrat, schließt nicht aus, daß neben ihr noch Massenkulturen angelegt und studiert werden müssen. Übrigens sind die Pilze diejenigen Mikroorganismen, für welche zuerst Isolierung und Kultur einzelner Zellen gefordert und erreicht worden ist (BREFELD).

Konzentration. — Eine optimale Nährlösungskonzentration für Pilzkulturen im allgemeinen anzugeben, ist nicht nur wegen der verschiedenartigen Ansprüche verschiedener Arten[2]), sondern auch wegen der großen Anpassungsfähigkeit der Pilze an die verschiedensten Konzentrationen ganz unmöglich. Man wird zunächst z. B. mit Konzentrationen zwischen 2 und 20 % Rohrzucker seine Versuche beginnen. Über das Wachstum von Schimmelpilzen auf hoch konzentrierten Lösungen stellten ESCHENHAGEN, v. MAYENBURG u. a.[3]) Versuche an: selbst ein osmotischer Druck, der dem von 20 % KNO_3 (oder 17 % NaCl) entspricht, läßt noch Pilzwachstum zu; KLEBS kultivierte *Eurotium repens* auf 100 %iger Rohr- und Traubenzuckerlösung. RACIBORSKI (1905) sah nicht nur auf konzentrierter Rohrzuckerlösung, sondern selbst noch auf gesättigter Lösung von Chlorlithium, welche den höchsten uns bekannten osmotischen Druck besitzt, eine *Torula* sich entwickeln.

Der Grad der Konzentration ist, wie schon BREFELD betont hat, von größtem Einfluß auf die Wuchsform eines Pilzes[4]) und die Entwicklung seiner Fruktifikationsorgane[5]); freilich sind neben diesem Faktor noch viele andere,

1) Über Alkoholgärung (Landwirtsch. Jahrb. 1874, **3**, 65), Meth. z. Unters. d. Pilze (ibid. 1875, **4**, 167).

2) Vgl. z. B. KLEBS, Bedingung der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen, Jena 1896, 460ff.

3) ESCHENHAGEN, Einfl. v. Lösungen verschied. Konzentration auf d. Wachst. von Schimmelpilzen, Leipzig 1889; RACIBORSKI, Üb. d. Einfl. äuß. Beding. auf die Wachstumsweise v. *Basidiobolus* (Flora 1896, **82**, 107); ERRÉRA, L., Hérédité d'un caractère acquis chez un champignon pluricellulaire (Bull. Acad. roy. Belgique, Cl. des Sc. 1899, 81); v. MAYENBURG, Lösungskonzentration u. Turgorrelation bei den Schimmelpilzen (Jahrb. f. wiss. Bot. 1901, **36**, 381); PANTANELLI 1904, a. a. O.; RACIBORSKI, Üb. d. ob. Grenze des osmotischen Druckes der lebenden Zelle (Bull. intern. Acad. Sc. Cracovie 1905, 461).

4) Über die Wachstumsweise des *Mucor racemosus* in 15 % KNO_3 oder 6—8 % NaCl vgl. RITTER, Über Kugelhefe und Riesenzellen bei einigen Mukorazeen (Ber. d. D. Bot. Ges. 1907, **25**, 255).

5) Beispiele z. B. bei BACHMANN, Einfl. d. äuß. Beding. auf die Sporenbildung von *Thamnidium elegans* LINK (Bot. Zeitg. 1895, **53**, 107); KLEBS, Zur Physiol. d. Fortpfl. einiger Pilze III (Jahrb. f. wiss. Bot. 1900, **35**, 80) u. a.

insbesondere die chemische Zusammensetzung, von maßgebender Bedeutung. Beobachtet man in nährstoffreichen Kulturen besondere Effekte der hohen Konzentration, so bleibt zu untersuchen, ob der reiche Gehalt an bestimmten Stoffen von hohem Nährwert oder lediglich der osmotische Druck der Lösungen ohne Rücksicht auf die chemische Qualität der Stoffe das Ausschlaggebende ist (vgl. KLEBS 1900 a. a. O.).

Wenn Pilze auch in hoch konzentrierten Lösungen ihr Wachstum fortsetzen, so geht daraus hervor, daß sie auch in diesen noch ihre Zellen turgeszent zu erhalten vermögen. Das geschieht nicht durch Aufnahme osmotisch wirksamer Stoffe von außen, sondern durch eigene Produktion solcher Stoffe. v. MAYENBURG (a. a. O.) machte es für *Aspergillus niger* wahrscheinlich, daß dabei ein Kohlehydrat entsteht (vgl. auch RACIBORSKI 1905 a. a. O.).

Über den Einfluß plötzlicher Konzentrationsänderungen äußerten sich ESCHENHAGEN (a. a. O.), KOSINSKY[1]) u. a. —

In hoch konzentrierten Lösungen ist das Wachstum der Hyphen im allgemeinen langsamer; die Zellenwände sind stärker, die Zellen kleiner als bei Kultur in schwächeren Lösungen. — Schon geringe Konzentrationsschwankungen rufen Deformationen der wachsenden Hyphenspitzen hervor.

Temperatur. — Die Größe der Sporen und ihre Oberflächenbeschaffenheit werden durch die Temperatur in hohem Maße beeinflußt; MANGIN empfiehlt für die Diagnose einer Pilzspezies diejenigen Verhältnisse zu verwerten, die beim Temperaturoptimum in Erscheinung treten.[2])

Über die geringe Widerstandsfähigkeit der Pilzmyzele gegenüber tiefen Temperaturen haben sich namentlich MAXIMOW, BARTETZKO und RICHTER geäußert.[3]) Nach BARTETZKO werden die Hyphen in unterkühlten Lösungen weniger geschädigt als in gefrierenden; RICHTER beobachtete, daß *Aspergillus*-Mycel am Leben bleibt, wenn es nach dem Auftauen in optimale Temperatur (30—34° C.) gebracht wird.

Thermophile Pilze findet MIEHE[4]) in erhitztem Heu, in Laub- und Düngerhaufen.

Reaktion des Nährbodens. — Pilze lieben im allgemeinen saure Reaktion des Nährbodens.[5]) Das ist insofern vorteilhaft, als Bakterien meist alkalische Reaktion vorziehen und daher im allgemeinen sauren Nährböden

1) Die Atmung bei Hungerzuständen usw. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1902, **37**, 137).

2) MANGIN, Sur la nécessité de préciser les diagnoses des moisissures (Bull. soc. bot. France 1908, **55**, 17; vgl. auch C. R. Acad. Sc. Paris 1908, **147**, 261).

3) MAXIMOW, N., Zur Frage über das Erfrieren d. Pfl. (Soc. imp. Nat. Petersbourg 1908, vgl. Bot. Zbl. 1909, **110**, 597). BARTETZKO, H., Untersuch. üb. d. Erfrieren von Schimmelpilzen (Jahrb. f. wiss. Bot. 1910, **47**, 57), RICHTER, A., Zur Frage über den Tod v. Pfl. infolge niedriger Temperatur (Jahrb. f. Bakt. II, 1910, **28**, 617).

4) MIEHE, H. Die Selbsterhitzung des Heues. Jena 1907. *Thermoidium sulfureum* n. g., n. sp., ein neuer Wärmepilz (Ber. d. D. Bot. Ges. 1907, **25**, 510).

5) Einen Versuch, die vorteilhafte Wirkung der Säuren zu erklären, bei BUTKEWITSCH, Umwandlungen d. Eiweißstoffe durch die nied. Pilze usw. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1903, **38**, 147).

fernbleiben, so daß die Pilzkulturen vor Verunreinigung durch unwillkommene Bakterien einigermaßen gesichert bleiben. Viele der für Pilzkulturen oben empfohlenen Nährböden sind an sich schon sauer — Pflaumensaft, Most, Gelatine usw. —; alkalische Nährmedien werden vor der Benutzung sauer gemacht, z. B. durch sparsamen Zusatz von Phosphorsäure[1]), von der noch 1 % gut vertragen wird, oder Salpetersäure oder organischen Säuren, (Zitronensäure u. a.).

Mit der Vorliebe der Pilze für saure Medien steht es selbstverständlich durchaus nicht in Widerspruch, daß bestimmte Säuren schlecht vertragen werden (Milchsäure, Buttersäure u. a.).

Eine Reihe von Pilzen überraschen durch ihre Widerstandsfähigkeit stark sauren Medien gegenüber; selbst freie Säure ist vielen zuträglich (Zitronensäure, Essigsäure, Weinsäure). In sauren Lösungen, in Zitronensaft u. dgl. siedelt sich nach WEHMER[2]) außer *Aspergillus niger* und *Penicillium luteum* noch *Citromyces Pfefferianus* an, der selbst 10—12 % Weinsäure noch verträgt. *Aspergillus niger* wächst nach NIKITINSKY[3]) noch auf 30 % Weinsäure u. dgl. m. Andrerseits fehlt es nicht an Pilzen, welche gegen saure Reaktion sehr empfindlich sind: die Saprolegniazeen sind nach KLEBS äußerst säureempfindlich und werden schon durch 0,005 % Weinsäure geschädigt.[4]) Auf Schimmelpilze, welche auch bei schwach alkalischer Reaktion der Nährlösung gut gedeihen, machte WEHMER (a. a. O.) aufmerksam.

Die Entwicklung der Pilze verändert die ursprüngliche Reaktion des Nährbodens nicht wenig. Wir werden hierauf und auf die Mittel, Reaktionsumschlag künstlich zu verhindern, später, bei Behandlung der Stoffwechselprodukte, zurückkommen.

Verhalten zu Sauerstoff, Gärung. — Die Pilze sind durchweg aërobe Organismen, die bei Sauerstoffzufuhr gedeihen und solche meist geradezu fordern. Einige können aber auch bei O-Abschluß kultiviert werden, wie die Hefen, *Mucor*, *Dematium* u. a.; in dem Nährmedium muß ihnen alsdann ein vergärbarer Zucker geboten werden. *Mucor racemosus*, welcher ebenso wie *M. mucedo* kräftig Gärung anregen kann, entwickelt bei aërober Lebensweise ein schlauchförmiges, einzelliges Myzel, bei anaërober Züchtung ein septiertes, vielzelliges[5]); auch *Dematium*myzel nimmt bei O-Zufuhr und O-Abschluß verschiedene Formen an.

Giftwirkungen. — Gegen Gifte sind Pilze im allgemeinen recht widerstandsfähig, jedenfalls sehr viel weniger empfindlich als Algen. Von zahl-

1) Über die Wirkung der Phosphorsäure vgl. WEHMER, Entsteh. u. phys. Bedeut. der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze (Bot. Ztg. 1891, **49**, 233).

2) Beiträge zur Kenntnis einheimischer Pilze II. Jena 1895.

3) Über die Beeinflussung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte (Jahrb. f. wiss. Bot. 1904, **40**, 1).

4) Zur Physiologie d. Fortpfl. einiger Pilze II (Jahrb. f. wiss. Bot. 1899, **33**, 513).

5) Vgl. KLEBS, Beding. d. Fortpfl. einiger Algen und Pilze. Jena 1896.

reichen Forschern wurden insbesondere Untersuchungen über die Wirkung der Gifte auf Hefen und Schimmelpilze angestellt. Es sind zwei Gruppen von Giftwirkungen zu unterscheiden: relativ hohe Konzentrationen töten die Zellen der Pilze oder hemmen doch ihre Entwicklung, — hinreichend verdünnte Lösungen regen andrerseits das Wachstum der Versuchsobjekte an und steigern die Ernte an Trockensubstanz in überraschendem Maße. Was die anregende Wirkung verdünnter Giftlösungen betrifft, so gelang es zuerst RAULIN[1]), bei der Kultur von Schimmelpilzen den Nachweis zu erbringen, daß Zinksulfatlösung — hinreichend verdünnt — das Wachstum der Pilze fördert.[2])

Die RAULINsche Nährlösung, die auch heute noch zur Kultur von Pilzen verwendet wird, kann ihrer übermäßig komplizierten Zusammensetzung wegen kaum empfohlen werden und im Grunde nur historisches Interesse beanspruchen. RAULIN nimmt[3])

1500	Teile	Wasser	ferner	0,6	Teile	Kaliumkarbonat
70	„	Kandiszucker		0,25	„	Ammoniumsulfat
4	„	Weinsäure		0,07	„	Zinksulfat
4	„	Ammoniumnitrat		0,07	„	Eisensulfat
0,6	„	Ammoniumphosphat		0,07	„	Kaliumsilikat
0,4	„	Magnesiumkarbonat				

RAULIN gibt an, um wieviel die Ernte sinkt, wenn einer der Bestandteile der Lösung fortgelassen wird.

Die höchste stimulierende Wirkung wurde bei einer Dosis von 0,0001 n $ZnSO_4$ gefunden (35°). Auch nach 35 Generationen ließ sich ein schädigender Einfluß des Zn bei Verabfolgung in der genannten Konzentration nicht erkennen.[4])

Weitere Untersuchungen im Sinne RAULINS und PFEFFERS stellten zahlreiche Autoren[5]) auch mit anderen Substanzen an. Wie Zinksulfat

1) Etudes chim. s. la véget. (Ann. Sc. nat., Bot., ser. V, 1869, **11**, 91).

2) Die Tatsache, daß mit Zinksulfat üppigeres Wachstum erzielt wird als ohne solches, darf uns jedoch nicht dazu verführen, im Zinksulfat einen unerläßlichen Nährstoff zu sehen; vielmehr ist der Auffassung PFEFFERS zu folgen, nach welcher es sich in diesen und ähnlichen Fällen um die Wirkung von Giftstoffen handelt.

3) Modifizierte R.sche Lösung bei LAURENT a. a. O.

4) ARCICHOVSKY, V., Zur Frage über den Einfluß von $ZnSO_4$ auf eine Reihe von Generationen von *Asp. nig.* (Zbl. f. Bakt. II, 1908, **21**, 430). Vgl. auch JAVILLIER, M., Sur l'infl. favorable de très petites doses de zinc sur la végétation de *Sterigm. nigra* v. TIEGH. (C. R. Acad. Sc. Paris 1907, **145**, 1212; ferner ibid. 1908, **146**, 365). Über die Wirkung des Zn auf die Enzymabscheidung vgl. JAVILLIER, Infl. de la suppression du zinc du milieu de culture de l'*Aspergillus niger* sur la sécrétion du sucrase par cette mucédinée (C. R. Acad. Sc. Paris 1912, **154**, 383). REESE, H., Einfl. d. gebrauchten Nährlösung, des Zn und des Mn auf d. Wachst. v. *Asperg. niger* (Dissert. Kiel 1912).

5) RICHARDS, Die Beeinflussung des Wachstums einiger Pilze durch chem. Reize (Jahrb. f. wiss. Bot. 1897, **30**, 665); ONO, N., Zur Frage der chem. Reizmittel (Zbl. f. Bakt. II, 1902, **9**, 154; daselbst weitere Literaturangaben); CLARK, J. F., On the toxic effect delet. agents on the germin. and developm. of cert. filament fungi (Bot. Gaz. 1899, **28**, 289);

wirken auch andere Metallsalze (z. B. 0,004 % Kupfersulfat nach ONO, 0,066 % Manganchlorid, 0,2 % Eisensulfat usw. nach RICHARDS), sowie organische Gifte, z. B. Morphin (RICHARDS); manche Reizmittel steigern nur das vegetative Wachstum und hemmen die Sporenbildung.

Durch gleichzeitige Verabfolgung von zwei verschiedenen Reizmitteln (Zn und Mn) läßt sich die fördernde Wirkung, wie das Gewicht der Ernte zeigt, noch weiter steigern als durch eines der beiden Mittel.[1])

Hinsichtlich ihrer entwicklunghemmenden und tötenden Wirkung verhalten sich die Gifte verschiedenen Pilzen gegenüber sehr ungleich. Gewisse graduelle Unterschiede in der Giftwirkung scheinen freilich allen Pilzen gegenüber gleichmäßig zur Geltung zu kommen; so wirkt z. B. Sublimat noch in sehr schwacher Lösung tötend, während Mangan (Mangansulfat) nur schwache Wirkung entwickelt. Nach PULST (a. a. O.) ist für *Penicillium* noch Entwicklung möglich bei folgenden Konzentrationsverhältnissen:

1 Gramm-Molekül	Entwicklung	Sporenbildung
$MnSO_4$	in 0,4 l	0,4 l
$ZnSO_4$ oder $CuSO_4$	0,75	0,75
$Fe_2(SO_4)_3$	5	5
$Pb(NO_3)_2$	5	200
$NiSO_4$	10	10
$CdSO_4$ oder $CoSO_4$	100	100
$HgCy_2$	500	500
$HgCl_2$	2000	2000
$TlSO_4$	2000	10 000

Dabei ist aber zu beachten, daß die Wachstumsgrenzen durch die weitgehende Akkommodationsfähigkeit der Pilze verschoben werden können, besonders *Penicillium* ist sehr anpassungsfähig.[2]) Dazu kommt, daß nach IWANOFF[3]) die neben den Giftstoffen verabfolgten Nährstoffe über den Grad der Giftwirkung mit entscheiden: bei Ernährung mit Glyzerin und Ammo-

PULST, C., Die Widerstandsfähigkeit einiger Schimmelpilze gegen Metallgifte (Jahrb. f. wiss. Bot. 1902, **37**, 205); LE RENARD, Du chémauxisme des sels de cuivre solubles sur le *Penicill. gl.* (J. de Bot. 1902, **16**, 97). GÖSSL, Üb. d. Vork. des Mn in der Pfl. u. üb. seinen Einfl. auf Schimmelpilze (Beih. z. bot. Zbl. 1905, **18**, I, 119), BERTRAND et JAVILLIER. Infl. du manganèse sur le dével de l'*Aspergillus niger* (C. R. Acad. Sc. 1911, **152**, 225), BERTRAND, Extraord. sensib. de l'*Asp. nig.* vis-à-vis du mang. (ibid. 1912, **154**, 616; vgl. auch ibid. 1912, **154**, 381); REESE, 1912 a. a. O.

1) BERTRAND et JAVILLIER, Infl. combinée du Zn et du Mn sur le dével. de l'*Asp. nig.* (C. R. Acad. Sc. Paris 1911, **152**, 900; s. auch ibid. 1911, **152**, 1337); REESE a. a. O. fand dasselbe.

2) Nach PULSTS Untersuchungen scheint die Plasmahaut von P. für Cu-Salze völlig oder nahezu undurchlässig zu sein.

3) Über die Wirkungen einiger Metallsalze u. einatomiger Alkohole auf die Entw. von Schimmelpilzen (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **13**, 139).

niumnitrat ist Mangan am wenigsten giftig, giftiger wirken Kobalt, Nickel, Kupfer; bei Asparaginernährung ist dagegen die Reihenfolge Mangan, Kupfer, Kobalt, Nickel.

Von der Giftwirkung der freien Säuren war schon vorhin die Rede (s. auch unten „Stoffwechselprodukte").

Als fungizide Mittel bezeichnet man diejenigen Gifte, die als Schutz der höheren Pflanzen gegen parasitische Pilze praktische Anwendung finden: es handelt sich bei ihnen im wesentlichen um verschiedene Kupferpräparate und um Schwefel. Man übersprüht die Pflanzen mit „Bordeaux-Brühe" (in 1 l Wasser 20 g $CuSO_4$ und 20 g gebrannter Kalk) oder beizt mit $CuSO_4$-Lösung die Getreidekörner, um anhaftende Brandsporen zu töten. Die Bordeaux-Brühe wird dadurch wirksam, daß sich kleine Mengen des $Cu(OH)_2$ in kohlensäurehaltigem Regenwasser usw. lösen, oder auch von den Pilzzellen selbst Stoffe produziert werden, welche das Kupferhydroxyd lösen. — Schwefel wird vermutlich dadurch wirksam, daß kleine Mengen SO_2 entstehen.

Keimung.[1]) — Die Sporen der Pilze keimen im allgemeinen nur dann, wenn außer Wasser ihnen in diesem noch bestimmte Stoffe geboten werden. Auf reinem Wasser vermag nach Clark u. a. z. B. *Botrytis* zu keimen; nach Büsgen[2]) keimen *Botrytis, Erysiphe* und *Fusicladium* zwar auf Wasser, bilden aber Infektionsschläuche erst unter der Einwirkung bestimmter chemischer Reize. Bei vielen der in der Literatur vorliegenden Angaben über Keimung in „reinem„ Wasser bleibt leider die Frage, welchen Grad von Reinheit der Autor bei dem angewandten Wasser für ausreichend gehalten hat (s. o. S. 6), unbeantwortet. Die Wirkungen, welche von den Reizmitteln ausgehen und die Sporen zur Keimung bringen, lassen sich zurzeit noch nicht näher analysieren: Molisch[3]) stellte fest, daß *Aspergillus niger* nicht keimt, wenn Mg fehlt; doch zeigte Duggar[4]) für Mg und K, daß sich auch ihnen gegenüber verschiedene Arten verschieden verhalten; derselbe Autor konnte durch Zusatz von geringen Mengen Alkohol und auch Äther Sporen zur Keimung bringen (*Aspergillus flavus*); für Äther konstatierte Townsend[5]) an *Mucor* und *Penicillium* ähnliches; Clark (a. a. O.) fand, daß freie Säuren (ca. 0,5 %) bei *Aspergillus* Keimung hervorrufen usw. usw. Die bisher ermittelten Wirkungen sind untereinander so verschieden, daß es vorläufig nicht möglich scheint, ein allgemeines Gesetz aus den Beobachtungen abzuleiten, oder über die Stoffumsatzprozesse, die der Keimung vorausgehen müssen, Schlüsse zu ziehen. Jedenfalls sind die Sporen vieler Pilze schon für sehr geringe Dosen bestimmter Stoffe empfindlich; das beweist unter anderem

---

1) Von älterer Literatur vgl. etwa Hoffmann, K., Über Pilzkeimungen (Bot. Ztg. **17**, 209), Unters. üb. d. Keimung d. Pilzsporen (Jahrb. f. wiss. Bot. 1860, **2**, 267) und besonders de Bary, Vgl. Morph. u. Biol. d. Pilze 1884.

2) Über einige Eigenschaften d. Keimlinge parasit. Pilze (Bot. Ztg. 1893, **51**, I, 53).

3) s. o. 125, Anm. 1.

4) Phys. studies with refer. to the germin. of certain fungus spores (Bot. Gaz. 1901, **31**, 38).

5) Some notes upon the germination of spores (ibid. 1899, **27**, 124).

DUGGARS Versuch, nach welchem Wasser, das mit Paraffin in Berührung gekommen ist, Keimung hervorrufen kann; dabei ist zweifellos nicht das chemisch so indifferente „*parum affine*", sondern seine Verunreinigungen das Maßgebende. Der Versuch erinnert daran, wie vorsichtig man bei Beurteilung der „Reinheit" eines Wassers sein muß. NEGER[1]) sah die Keimung von Sporen kräftig gefördert, wenn neben die sporenhaltigen Wassertropfen Rinden-, Holz- oder Blattstückchen gelegt wurden; offenbar handelte es sich um gasförmige, durch die Luft übertragbare Stoffe, welche hier die Keimung anregten. FERGUSON[2]) und später DUGGAR[3]) förderten die Pilzkeimung, indem sie in die Kulturflüssigkeit ein Myzelstückchen der betreffenden Spezies legten (*Agaricus*, *Coprinus* und andere Basidiomyzeten). Die Resultate ihrer „tissue culture method" erinnert an die Wirkung von Narbenstückchen auf die Keimung der Pollenkörner. — Von besonderen Fällen erwähne ich noch die Wirkung des Magensaftes auf die Sporen, bei der wohl proteolytischen Fermenten die Hauptrolle zukommt (z. B. Zygoten von *Basidiobolus lacertae* nach LOEWENTHAL)[4]); eine nähere Nachprüfung dieser Fälle wäre gewiß erwünscht.

Weiterhin verspricht schöne Resultate eine Fortsetzung derjenigen Studien, welche sich mit dem Einfluß von Entwicklungszustand, Alter und Vorbehandlung der Sporen auf ihre Keimung befassen. NEGER (a. a. O.) z. B. beobachtete, daß unreife, dem Askus entnommene Sporen leichter keimen als spontan entleerte. Sporen von *Ustilago Maydis* keimen nach BREFELD in Wasser nur dann, wenn sie eine Ruheperiode durchgemacht haben; bei 8 Jahr alten Sporen von *U. Panici miliacei* dagegen war wieder Nährlösung notwendig. HECKE[5]) zeigte, daß *Ustilago*sporen, deren Membran Cu gespeichert hat, nicht keimen können; — wird das Kupfer mit verdünnter Säure ausgewaschen, so sind die Sporen wieder keimfähig. ERIKSSON[6]) gibt an, daß Uredo- und Äzidiensporen besser keimen, wenn sie niedrige Temperaturen durchgemacht haben; Mitteilungen über den Einfluß des Lichtes, der Temperatur usw. bei KLEBAHN und DIETEL.[7])

---

1) Über Förderung der Keimung v. Pilzsporen durch Exhalationen v. Pflanzenteilen (Naturwiss. Wochenschr. f. Land- u. Forstwirtsch. 1904, **2**, 484).

2) A prelim. study of the germination of the spores of *A. campestris* and other basidiom. fungi (Bull. No. 16, Bur. of Pl. Industry U. S. Dpt. Agricult. Washington 1902).

3) The principles of mushroom growing and mushr. spawn making (ibid. Bull. No. 85. Washington 1905).

4) BREFELD 1875, a. a. O., LOEWENTHAL, W., Beitr. z. Kenntn. des *Bas. lacertae* EIDAM (Arch. f. Protistenkunde 1903, **2**, 364) u. a.

5) Beizversuche zur Verhütung d. Hirsebrandes (*Ustilago Crameri* u. *U. Panici miliacei*) (Zeitschr. f. landw. Versuchsw. Österr. 1902, **5**).

6) Über die Förderung der Pilzsporenkeimung durch Kälte (Zbl. f. Bakt. II, 1895, **1**, 557).

7) KLEBAHN, Wirtwechselnde Rostpilze, Berlin 1904. DIETEL, P., Vers. über die Keimungsbeding. d. Teleutosp. einiger Ured. (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **31**, 95).

Wie lange bleiben Sporen überhaupt keimfähig? Die Sporen vieler Saprophyten bewahren ihre Keimfähigkeit bei trockener Aufbewahrung sehr lange. Besonders für *Aspergillus* liegen zahlreiche Angaben vor. So kann *Aspergillus glaucus* 16 Jahre lebend bleiben; für *A. flavescens* fand HANSEN[1]) die Grenze bei ungefähr 8 Jahren. Andere Arten derselben Gattung, ebenso *Mucor mucedo*, *M. racemosus* u. a. bleiben 6 Jahre lang keimfähig. Ein seltener Pyrenomyzet (*Anixiopsis stercoraria*) keimt noch nach 21 Jahren (HANSEN). Andere Pilze kommen ihm hierin gewiß gleich. Auch WEHMER stellte für *Aspergillus* u. a. einige Daten zusammen.[2]) Hefesporen bleiben ebenfalls jahrelang keimfähig. *Phycomyces* steht in dem Rufe, daß seine Sporen schnell absterben; bei trockener Aufbewahrung halten sich aber auch sie viele Monate lang lebendig. Wie entscheidend der Wassergehalt des Plasmas für die Keimfähigkeit und die Lebensdauer der Sporen ist, zeigen KURZWELLYS Versuche[3]): exsikkatortrockene *Phycomyces*sporen bleiben in absolutem Alkohol aufbewahrt über zwei Jahre keimfähig.

Formative Effekte. — Wenn man den Einfluß äußerer Bedingungen auf Wachstum und Organbildung bei den Pilzen prüfen will, was für Faktoren kommen dabei erfahrungsgemäß in erster Linie in Betracht? Vor allem die chemische Zusammensetzung des Nährsubstrats, — nicht nur deswegen, weil von ihr Wachstum und Gedeihen des Pilzes überhaupt abhängen, sondern weil verschiedene Nährstoffe einen Pilz zu ganz verschiedenen Wachstumsleistungen anregen können. Für *Sporodinia grandis* z. B. stellte KLEBS fest, daß Kohlehydraternährung zur Zygotenbildung, Peptonernährung zur Bildung von Sporangien führt.[4]) RACIBORSKI (a. a. O.) beobachtete, daß *Basidiobolus ranarum* in Glukose u. a. eine Art Palmellenform, in Galaktose u. a. Zygosporen bildet. Auch die Form der vegetativen Myzelanteile fällt bei verschiedener Ernährung verschieden aus: *Mucor racemosus* bildet bei Peptonernährung dünne Haupthyphen mit spitz endigenden Seitenästen, bei Zuckerernährung dicke Haupthyphen mit stumpf endigenden Seitenästen; Riesenzellen entstehen in Pflaumensaft + 3 % Zitronensäure u. dgl. m.[5])

Zweitens ist die Transpiration von größter Bedeutung. Im dampfgesättigten Raume kultiviert, produzieren die Pilze reichlich Myzel, aber die Fruktifikation bleibt entweder völlig aus oder bleibt zum mindesten unvollkommen. Auf Pilze, die ihren ganzen Entwicklungsgang submers durch-

1) Biologische Untersuchungen über Mist bewohnende Pilze (Bot. Ztg. 1897, I, **55**, 111).

2) Kleinere mykol. Mitteil. (Zbl. f. Bakt. II, 1897, **3**, 102), Über d. Lebensdauer eingetrockneter Pilzkulturen (Ber. d. D. Bot. Ges. 1904, **22**, 476).

3) Widerstandsfähigk. trockn. pflanzl. Organismen gegen giftige Stoffe (Jahrb. f. wiss. Bot. 1903, **38**, 291, 329).

4) Zur Physiol. d. Fortpfl. einiger Pilze III (Jahrb. f. wiss. Bot. 1900, **35**, 80).

5) Vgl. RITTER, G., Über Kugelhefe und Riesenzellen bei einigen Mukorazeen (Ber. d. D. Bot. Ges. 1907, **25**, 255).

machen, hat dieser Faktor natürlich keine Wirkung. Über reichliche Sporangienbildung bei *Sporodinia* und reichliche Konidienbildung bei *Sporodesmium* und *Botrytis cinerea* unter dem Einfluß geförderter Transpiration vgl. KLEBS (a. a. O. 1900 S. 44) und REIDEMEISTER (s. u.). Fruktifikationsorgane, die bei sehr schwacher Transpiration gebildet werden, bleiben in vielen Fällen hinsichtlich ihrer Struktur und Differenzierung hinter den „typischen" zurück. Bei der Beurteilung des Wasserdampfgehaltes über einer Pilzkultur und der Intensität ihrer Transpirationstätigkeit berücksichtige man die oben (S. 79) angeführten Punkte.

Alle äußeren Faktoren, welche auf irgendeinem Wege die Transpiration der Pilzzellen beeinflussen, gewinnen indirekt Einfluß auf die von der Transpiration abhängigen Gestaltungsprozesse; höchst wahrscheinlich ist der Einfluß des Lichtes nur ein mittelbarer im angeführten Sinne. Namentlich BREFELD[1]) hat die Beziehungen zwischen Licht und Fruchtbildung vieler Pilze dargetan. Daß die Fruchtkörper mancher Pilze im Dunkeln gleich etiolierten höheren Pflanzen abnormale Formen annehmen, ist bekannt.

Für *Botrytis* stellte KLEIN[2]) fest, daß die Sporen ausschließlich in der Nacht gebildet werden.

Ein weiteres Mittel, die Organbildung zu beeinflussen, insbesondere Fruktifikation hervorzurufen, besteht im Entzug der Nahrung. Wird der Nährstoff von dem heranwachsenden Organismus verbraucht, oder wird dieser in ein nährstoffarmes oder gar -freies Medium übertragen, so wird die Fruktifikation eingeleitet. Gemmen sind bei *Mucor* ein Zeichen für Nahrungsmangel; *Nectria cinnabarina* u. a. bilden Konidien, sobald die Nährstoffe verbraucht sind[3]); an Hefen ruft man Askosporenbildung hervor, indem man sie auf ein nährstoffreies Substrat überträgt (s. u.). Die Reaktion auf den Entzug der Nahrung tritt aber nur dann prompt ein, wenn der Pilz vor dem Entzug der Nahrung gut ernährt worden ist: hungerndes Myzel wird durch völliges Entziehen der Nährstoffe durchaus nicht zum Fruktifizieren angeregt.

Die hier angeführten Mittel, einen Pilz zu besonderen Gestaltungsleistungen anzuregen, kommen beim Experimentieren wohl in erster Linie in Betracht. Damit soll selbstverständlich nicht gesagt sein, daß nicht auch andere Mittel und Faktoren sich als wirksam erweisen oder vielleicht in diesem oder jenem Fall schneller und bequemer zum Ziele führen können als die soeben angeführten. Man wird neben diesen an die Wirkung bestimmter Konzentrationen, an die Wirkung der sauren und alkalischen

1) Vgl. Botan. Untersuch. H. III, IV u. VIII, 1877, 1881, 1889; ferner KLEBS, Z. Phys. d. Fortpfl. einiger Pilze III (a. a. O.) und LAKON, Beding. d. Fruchtkörperbildung bei *Coprinus* (Ann. mycol. 1907, **5**, 155).

2) Über die Ursachen der ausschließlich nächtlichen Sporenbildung von *B. cinerea* (Bot. Ztg. 1885, **43**, 6).

3) WERNER, C., Die Beding. der Konidienbildung bei einigen Pilzen. Dissertation Basel 1898.

Reaktion zu denken haben, schließlich auch an die chemische Wirkung von Stoffen, die weder die Reaktion bestimmen noch als Nährstoffe bezeichnet werden können, vielmehr den wachstumanregenden Reizmitteln und Stoffwechselprodukten angehören (s. später *Ascobolus*).

Hexenringe. — Eine ganz alltägliche Erscheinung bei Pilzkulturen ist die Bildung der sog. Hexenringe: die bei Kultur auf Agar- oder Gelatineplatten sich bildende Myzelscheibe ist nicht homogen, sondern zeigt deutliche konzentrische Zonen, die dadurch zustande kommen, daß die Myzelbildung abwechselnd dicht und minder dicht oder die Sporen-, Stroma- oder Sklerotienbildung abwechselnd spärlich und reichlich erfolgt. Das Phänomen der Ringbildung, das naturgemäß zuerst bei den stattlichen Fruchtkörpern verschiedener Basidiomyzeten die Aufmerksamkeit auf sich lenkte, ist schon für zahlreiche kultivierbare Pilze beschrieben und untersucht worden[1]), bedarf aber trotzdem noch sehr der näheren Erforschung.

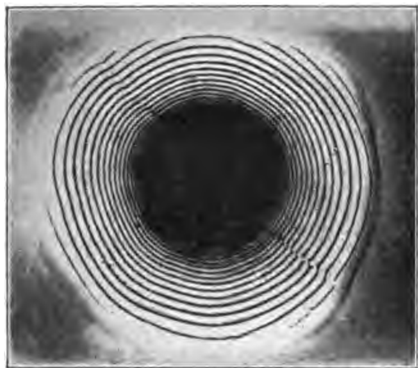


Fig. 20. LIESEGANGsche Diffusionsringe: Silbernitrat auf Kaliumbichromatgelatine. Nach einer photographischen Aufnahme LIESEGANGS.

Daß die Bildung eines Ringes mit dem Wechsel von Tag und Nacht zusammenhängt, läßt sich bei Beobachtung von *Penicillium-*, *Aspergillus-*, *Acrostalagmus-* und andern Kulturen leicht beobachten. REIDEMEISTER hat gezeigt, daß die Sklerotienringe der *Botrytis cinerea* von der Transpiration des Pilzes abhängig sind[2]), und MUNK konnte nachweisen, daß die Konidientagesringe der zuerst genannten Pilze auch bei Dunkelkulturen gebildet werden, wenn durch künstlich gesteigerte Transpiration oder Temperatur die Wirkungen der täglichen Belichtung ersetzt werden.[3])

1) Vgl. z. B. MILBURN, Über Änderungen der Farben bei Pilzen und Bakt. Diss. Halle 1904. HUTCHINSON, Über Form u. Bau der Kolonie niederer Pilze (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **17**, 417ff.). MOLZ, Über die Beding. d. Entstehung der durch *Sclerotinia fructigena* erzeugten Schwarzfäule der Äpfel (ibid. 175). FREEMAN, O. L., Untersuch. üb. d. Stromabildung der *Xylaria hypoxylon* in künstl. Kult. (Ann. mycol. 1910, **8**, 192) u. v. a. (s. u.). — Auch parasitisch lebende Pilze bilden auf ihrem lebendigen Substrat manchmal sehr deutliche Ringe (vgl. z. B. Abbildung von *Vermicularia trichella* bei DIEDICKE, Blattfleckenkrankh. des Efeu. Zbl. f. Bakt. II, 1907, **19**, 168), Die Ringe der Monilien (*M. cinerea*), die auf dem natürlichen Substrat der Parasiten sichtbar werden, sind zuweilen erstaunlich scharf ausgeprägt.

2) REIDEMEISTER, Die Beding. d. Sklerotien- u. Sklerotienringbildung von *Botr. cin.* auf künstl. Nährböden (Ann. myc. 1909, **7**, 19).

3) MUNK, M. Beding. d. Hexenringbildung bei Schimmelpilzen (Zbl. f. Bakt. II, 1912, **32**, 353). Bei *Penicillium luteum* bilden sich nach KNISCHEWSKY (Tagesringe bei *P. l.*, Landwirtsch. Jahrb. 1909, **38**, Erg.-Bd. **5**, 341) die Ringe nur in weißem und blauem Lichte; sie bleiben im roten Lichte und bei Dunkelheit aus.

MUNK hat auf die Ähnlichkeit zwischen den Konidienringen vieler Schimmelpilze und den LIESEGANGschen Diffusionsringen[1]) aufmerksam und den Versuch gemacht, die Diffusions- und Konzentrationsverhältnisse zu analysieren, die im Nährboden unter dem Einfluß eines sich ausbreitenden Pilzmyzels zustande kommen. Auf alle Fälle ist die Ähnlichkeit zwischen LIESEGANGS Diffusionsringen und den „Hexenringen" der Schimmelpilze sehr sinnfällig und gewiß nicht bedeutungslos; Fig. 20 und 21 sollen die Über-



Fig. 21. Hexenringe der *Streptothrix coelicolor* (nach R. MÜLLER)[2]).

einstimmungen zwischen diesen und jenen veranschaulichen. Bei künftigen Untersuchungen wird, wie ich glaube, namentlich zu prüfen sein, inwieweit die Diffusion der von den Organismen ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte, welche vor der Kolonie her im Nährboden sich zentrifugal verbreiten, zonenartig wechselnde Existenzbedingungen für die Pilze schaffen oder die in den lebenden Zellen und Zellenreihen des Pilzes selbst sich verbreitenden Stoffe nach Art der von LIESEGANG gewählten Chemikalien die Zonenbildung veranlassen.[3])

1) Vgl. LIESEGANG, R., Über die Schichtungen bei Diffusionen. Düsseldorf 1907. Über die Bedeutung d. hydrolyt. Spaltung d. Gelatine f. d. Schichtenbildung d. Silberchromats (Ztschr. f. Chem. u. Industr. d. Koll. 1907, **2**, Nr. 3).

2) MÜLLER, R., Eine Diphtheridee und eine *Streptothrix* mit gleichem blauen Farbstoff etc. (Zbl. f. Bakt. I, Orig., 1908, **46**, 195).

3) Ich möchte in diesem Zusammenhang auch auf einige von BEYERINCK (Über die Absorptionserschein. bei d. Mikroben, Zbl. f. Bakt. II, 1911, **29**, 161) veröffentlichte Be-

Der Abstand der Ringe voneinander fällt bei verschiedenen Kulturbedingungen sehr verschieden aus. Nach MILBURN hat der innerste Ring von *Hypocrea rufa* bei Kultur auf 2—5 % Glukose einen Durchmesser von ca. 3 cm; bei 10 % Glukose ist er nur 1 cm weit (MILBURN, s. o.).

Stoffwechselprodukte. — Von den mannigfaltigen Stoffwechselprodukten der Pilze sind zunächst diejenigen zu nennen, welche die Reaktion des Nährbodens in dem einen oder anderen Sinne beeinflussen.

Ursprünglich saure Nährböden können durch alkalisch reagierende Stoffwechselprodukte neutralisiert und alkalisch gemacht werden, oder der Grad ihrer Azidität kann infolge der Säureproduktion des Pilzes noch steigen. Im ersten Fall kann man durch Einlegen schwer löslicher saurer Stoffe, wie Weinstein, die Reaktion sauer erhalten; zum Neutralisieren dient z. B. Kalziumkarbonat.

Der Einfluß der Pilze auf die Reaktion des Nährbodens ist verschieden je nach der Spezies und der jeweiligen Ernährung. Zuckerernährung führt im allgemeinen zu Säurebildung, Ernährung mit Pepton zu Produktion von Ammoniak. Verbraucht ein Pilz bei Ernährung mit Ammonsalzen das Ammon, so kann es zu starker Ansäuerung des Kulturmediums kommen; andrerseits kann bei Nitraternährung der Nährboden allmählich an Alkaleszenz gewinnen. Bleibt die Reaktion des Nährbodens sauer (durch Säureproduktion seitens des Pilzes oder durch künstlichen Zusatz von Säure), so wird die Bildung von Ammoniak gefördert; verzögert wird sie, wenn der Nährboden alkalische Reaktion annimmt.[1])

Unter den Säuren spielt die namentlich von Schimmelpilzen gebildete Oxalsäure eine besondere Rolle. Als leicht dissoziierbare Säure wirkt sie selbst in geringen Mengen schon giftig auf viele Mikroorganismen; *Asper-*

---

trachtungen aufmerksam machen. Daß die in einem Nährboden enthaltenen Nährstoffe von den Mikroorganismen restlos (oder nahezu restlos) aufgenommen werden können und das Wachstum der letzteren erst merklich später einsetzen kann, demonstriert der genannte Forscher z. B. durch Kultur von *Oidium lactis* auf glukosehaltigem, aber N-freiem Agar- oder Gelatinemedium. Wird irgendwo assimilierbarer N — z. B. einige Kristalle von Harnstoff oder eines Ammonsalzes — aufgetragen, so erfolgt zunächst Verbreitung der letzteren durch Diffusion; ist eine absorbierbare Verdünnung des Harnstoffes erreicht, so folgt eine „Absorptionsperiode, während welcher die Zellen zunächst speichern, vielleicht auch schon wachsen, was mit der Möglichkeit des Nachweises innerhalb der Zellen der nicht mehr frei diffundierenden Substanz einhergeht. Schließlich tritt die Periode des Hauptwachstums ein, wobei die Substanz schnell verschwindet." Mit der vorangehenden Absorption der Nährstoffe hängt es zusammen, daß das von kräftig wachsenden Organismen erfüllte Diffusionsfeld keine diffuse, sondern eine völlig scharfe Grenze hat — vorausgesetzt, daß die Organismen dicht genug in der Gallert ausgesät waren. So vermag die vorübergehende Absorption der Nährstoffe nach BEYERINCK Hexenringe zu erzeugen.

1) Vgl. z. B. BUTKEWITSCH, W., Umwandlung der Eiweißstoffe durch die niederen Pilze usw. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1903, **38**, 147), MEDISCH, M., Beitr. z. Phys. d. *Hypocrea rufa* (PERS.) (ibid. 1910, **48**, 591).

gillus niger, welcher reichlich Oxalsäure bildet, verträgt nach NIKITINSKY[1]) bis 1,5 % freie Säure. Die Bildung von Oxalsäure durch Pilze ist abhängig von den Ernährungsverhältnissen; WEHMER[2]) hat die Bildung der Säure durch *Aspergillus* in ihrer Abhängigkeit von der Ernährung erforscht: gebundene Oxalsäure tritt in Zuckerkulturen bei N-Ernährung mit Kalium-, Natrium-, Kalziumnitrat, Ammoniumphosphat oder -oxalat oder Pepton auf; Ernährung mit Ammoniumnitrat führt zur Bildung freier Oxalsäure, während in Chlorammonium- und Ammoniumsulfatkulturen keine Oxalsäure entsteht. — Zitronensäure bilden *Penicillium luteum, Citromyces Pfefferianus* u. a. (WEHMER). Milchsäure bildet *Rhizopus chinensis.*[3])

Über die Prüfung der Säureproduktion der Pilze mit Hilfe von Marmorplatten, die von den Hyphen korrodiert werden, vgl. KUNZE.[4])

Die von den Pilzen, insbesondere den Schimmelpilzen, gelieferten Fermente sind sehr mannigfaltig: diastatische, invertierende und proteolytische sind die wichtigsten. Von den Fermenten der Hefen wird später zu sprechen sein. Wichtig ist, daß die Produktion der Fermente z. B. der Diastase quantitativ von der Ernährung beeinflußt wird[5]); gewisse andere Fermente werden überhaupt nur bei bestimmter Ernährung und manche sogar nur dann gebildet, wenn der Körper, der von ihnen gespalten werden soll, in dem Nährboden vorhanden ist.[6]) Über den Nachweis von Enzymen durch bestimmte Kulturmethoden s. o., über die Korrosion fester Stärke durch Pilze vgl. BILLINGS.[7]) Katalase entsteht in Pilzkulturen je nach Spezies und Kulturbedingungen in wechselnden Mengen, nicht selten außerordentlich reichlich.[8])

---

1) Üb. d. Beeinfl. d. Entwickl. einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte (Jahrb. f. wiss. Bot. 1904, **40**, 1).

2) Entsteh. u. physiol. Bedeut. d. Oxals. im Stoffwechsel einiger Pilze (Bot. Ztg. 1891, **49**, 233); daselbst weitere Literatur.

3) SAITO, K., Ein Beispiel von Milchs.-Bildung durch Schimmelpilze (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **29**, 289).

4) Üb. Säureausscheidungen bei Wurzeln u. Pilzhyphen und ihre Bedeutung (Jahrb. f. wiss. Bot. 1906, **42**, 357).

5) KATZ, Regul. Bild. v. Diastase durch Pilze (ibid. 1895, **31**, 599).

6) WENT, Üb. d. Einfl. d. Nahrung auf d. Enzymbildung durch *Monilia sitophila* (ibid. 1900, **36**, 611).

7) Üb. Stärke korrod. Pilze u. ihre Beziehungen zu *Amylotrogus* ROZE (Flora 1900, **87**, 288); daselbst weitere Literaturangaben.

8) DOX (The catalase of molds, Journ. americ. chem. soc. 1910, **32**, 1357) ermittelte die Quantität der von Pilzen gelieferten Katalase in der Weise, daß er 5 ccm der Nährlösung, auf welcher die Pilze zwei Monate sich entwickelt hatten, mit 10 ccm Wasser verdünnte und 2 ccm Perhydrol zusetzte. Nach 3 Minuten hatten geliefert:

Nährlösung von *Penicillium Duclauxi*	25,3 ccm	Sauerstoff
„ „ *Aspergillus glaucus*	21,1 ccm	„
„ „ *Pen. luteum*	0,2 ccm	„
„ „ *Asp. niger*	0,0 ccm	„

Eine dritte Gruppe von Stoffwechselprodukten sind die von vielen Pilzen ausgeschiedenen, meist gelben, grünen und roten Farbstoffe, deren Produktion quantitativ und qualitativ von den Kulturbedingungen abhängt[1]), insbesondere von der Reaktion des Nährbodens. Auffallende Bilder liefern die Kulturen, in welchen die Reaktion des Nährbodens an verschiedenen Stellen ungleich ist, z. B. die Kulturen derjenigen Pilze, die nur bei Berührung verschiedener Kolonien oder vorzugsweise bei Berührung mit artfremden Pilzkolonien Pigment erzeugen u. dgl. m. Nicht selten können von der nämlichen Pilzspezies mehrere Farbstoffe gebildet werden; je nach den Kulturbedingungen wird der eine oder der andere von ihnen besonders auffällig.

Ferner muß noch auf die wachstumhemmende und wachstumfördernde Wirkung gewisser Stoffwechselprodukte (vgl. S. 89) hingewiesen werden, die teils von Produkten der erwähnten Art, teils noch von besonderen, nicht näher bekannten und oft nur aus ihrer Wirkung auf das Wachstum erschlossenen Stoffen ausgeht.

Daß die von einem Pilze oder einem anderen Organismus gelieferten Stoffwechselprodukte nicht nur auf die nämliche Spezies, sondern auch auf andere Arten wachstumhemmend oder wachstumfördernd einwirken können, geht aus vielen gelegentlichen Beobachtungen hervor, bedarf aber noch näherer Erforschung: FALCK beobachtete z. B., daß *Coprinus* seine Nährböden für Schimmel- und Bakterieninfektion unzugänglich macht[2]); MOLLIARD gibt an, daß die Perithezien von *Ascobolus furfuraceus* in Reinkulturen später gebildet werden als in Kulturen, die mit Bakterien verunreinigt sind[3]) u. dgl. m.

Wachsen zwei getrennte Myzelscheiben einander entgegen, so wird unter geeigneten Ernährungsbedingungen das Wachstum mancher Pilze bei einer bestimmten Annäherung der beiden Myzelspitzen rapid verlangsamt; die Stoffwechselprodukte eilen dabei durch Diffusion den wachsenden Myzelspitzen voraus[4]), und die beiden Myzelplatten halten sich zuweilen gegenseitig im Schach, so daß die zwischen ihnen liegenden Streifen des Nähr-

---

1) Einige Literatur bei MILBURN, Üb. Änderungen der Farben bei Pilzen u. Bakt. (Dissertation, Halle 1904); BESSEY, Üb. d. Beding. d. Farbbildung bei *Fusarium* (ebenso; auch Flora 1904, **93**, 301). DÖBELT, H., Beitr. zur Kenntnis eines pigmentbildenden Penicilliums. (Diss. Halle 1909.). SELIBER, G., Sur le virage du pigment de deux champ. (C. R. Acad. Sc. Paris 1910, **150**, 1707; Mitt. üb. d. Farbst. von *Fusarium Heidelbergianum n. sp.* und *Cephalosporium subsessile n. sp.*). MEDISCH, M., Beitr. z. Phys. d. *Hypocrea rufa* (PERS.) (Jahrb. f. wiss. Bot. 1910, **48**, 591). NAUMANN, K. W., Die Beding. f. d. Pigmentbildung durch *Epicoccum purpurascens* (EHRENB.). Berlin 1910.

2) Die Kultur d. Oidien u. ihre Rückführung in die höh. Fruchtform d. Basidiomyzeten (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1902, **8**, 307).

3) MOLLIARD, M., Rôle des bactéries dans la production des périthèces des *Ascobolus* (C. R. Acad. Sc. Paris 1903, **136**, 899).

4) Vgl. FULTON, K. F., Chemotropism of fungi (Bot. Gaz. 1906, **41**, 81).

substrates dauernd unbewachsen bleiben können. In anderen Fällen kommt es noch zur Berührung der beiden Myzelscheiben, deren Randhyphen dabei mancherlei formative Wirkungen der gegenseitigen Beeinflussung erkennbar werden lassen; in noch anderen Fällen wird einer der beiden Pilze von dem anderen überwachsen.[1])

NIKITINSKY[2]) stellte fest, daß durch die Produktion von Säuren (z. B. bei Darbietung anorganischer Ammonverbindungen, deren Ammoniak aufgenommen wird) oder durch Umschlagen der Reaktion ins Alkalische (Entstehung von Ammoniumkarbonat) die Nährböden für Pilze ungeeignet werden.[3]) Von der „Verbesserung", welche die Nährlösungen während der Entwicklung der Pilze erfahren, und von der Keimung neuer Aussaaten auf gebrauchten Nährlösungen war schon oben (S. 90) die Rede. —

Hier müssen wir auf die von WILDIERS näher studierte Substanz „Bios" kurz eingehen. WILDIERS machte die Beobachtung, daß Bierhefen, die in einer mit den notwendigen Mineralstoffen versehenen Zuckerlösung ausgesät werden, sich nur bei Aussaat größerer Mengen entwickeln[4]); er fand, daß Extrakt aus Hefezellen einen Stoff enthält, der auch geringen Aussaatmengen auf gezuckerten Mineralsalzlösungen üppiges Wachstum gestattet, und weiterhin, daß in Most u. dgl. der erforderliche Stoff von vornherein enthalten ist; WILDIERS nannte den wichtigen Stoff, den wir vielleicht zu den wachstumanregenden Stoffwechselprodukten rechnen dürfen, „Bios"[5]). Nach DEVLOOS Untersuchungen handelt es sich um einen N-haltigen Stoff, der sich im Lezithin vorfindet. —

Die Pilze von den Stoffwechselprodukten, die sich in den Nährlösungen befinden, zu trennen, ist im allgemeinen nicht schwer. Sollte die Wirkung

---

1) Vgl. namentlich HARDER, R., Üb. d. Verhalten von Basidiomyz. u. Askomyz. in Mischkult. (Naturwiss. Ztbl. f. Forst- u. Landwirtsch. 1911; auch Dissert. Kiel 1911).

2) Über d. Beeinfl. einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte (Jahrb. f. wiss. Bot. 1904, **40**, 1). Vgl. auch LUTZ, Üb. d. Einfl. gebraucht. Nährlös. auf Keimung u. Entwickl. einiger Schimmelpilze (Ann. Mycol. 1909, **7**, 91; auch Dissert. Halle 1909).

3) Man hat versucht, die Bildung der Stoffwechselprodukte auch vom teleologischen Standpunkt aus zu deuten: Pilze bilden Säuren und schließen dadurch im Kampf ums Dasein und ums Substrat andere Mikroben aus, die Hefe produziert Alkohol, den gewisse andere Organismen nicht vertragen — allerdings mehr als ihr selbst bekömmlich ist. Solchen Erklärungsversuchen gegenüber wird Skepsis angebracht sein.

4) Üb. BREFELDS Beobachtung s. o. p. 27.

5) Die wichtigsten Arbeiten über die Biosfrage sind in La Cellule erschienen: WILDIERS, Nouv. subst. indispensable au dével. de la levure (1901, **18**, 311); AMAND, A., Le „bios" de W. ne joue pas le rôle d'un contrepoison (1903, **20**, 223), La disparition du bios de W. d. l. cultures de levure (1904, **21**, 327), DEVLOO, R., Purification du bios de W. (1906, **23**, 359), IDE, M., Über WILDIERS' Bios (Zbl. f. Bakt., II, 1907, **18**, 193). — Über die Förderung der Hefeentwicklung durch Gärungsprodukte vgl. THIBAUT, FR., Einfluß d. alkoholischen Gärungsprod. auf Hefe u. Gärverlauf (Zbl. f. Bakt. II, 1902, **9**, 743).

gebrauchter Lösungen auf neue Aussaaten geprüft werden, so leisteten mir U-förmig gekrümmte Eprouvetten gute Dienste (Fig. 22): in einem Schenkel wurde die Aussaat vorgenommen; der andere wurde erst besät, wenn hinreichende Mengen von Stoffwechselprodukten in der Lösung vermutet wurden; wenn Gefahr bestand, daß submerse Hyphen des zuerst ausgesäten Pilzes von einem Schenkel in den andern sich verbreiteten, wurde der Weg durch einen lockeren Pfropf Glaswolle verlegt; diese Form des Verschlusses genügt für sehr viele Fälle. Handelte es sich darum, den Einfluß gebrauchter Nährlösungen auf bereits entwickelte Pilze zu prüfen, so bediente ich mich W-förmiger Röhren (Fig. 23). Die Nährlösung steht in diesen nur so hoch, daß zwei getrennte Kulturräume verfügbar werden; beide werden mit verschiedenen Pilzspezies besät, und später läßt man durch geschicktes Neigen der gekoppelten Kulturen ein Quantum der einen Nährlösung zu der anderen überfließen.

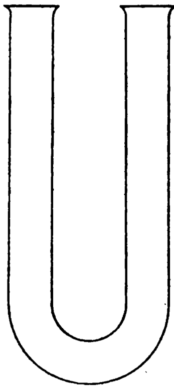


Fig. 22.

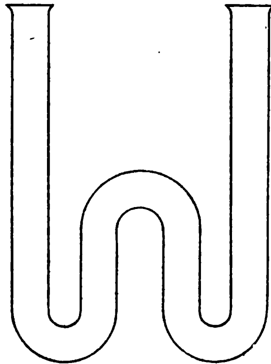


Fig. 23.

Sehr zweckmäßig fand ich es ferner bei Untersuchung der Keimung von Pilzsporen auf gebrauchten Nährmedien, die Myzelien in Petrischalen auf Agar sich entwickeln zu lassen, dann die Agarmassen umzudrehen und auf der Kehrseite die Neuaussaat vorzunehmen. Irrtümer und Verwechslungen, welche die den Agar durchwachsenden Hyphen des zuerst ausgesäten Pilzes veranlassen könnten, lassen sich bei mikroskopischer Kontrolle leicht ausschließen.

Rassenbildung. — Abgesehen von der Beobachtung, daß Pilze sich an Gifte, hohe Konzentrationen usw. gut anpassen können, und ihre Nachkommenschaft besonders widerstandsfähig wird, liegen für Pilze nur wenig Beobachtungen vor, die als Beiträge zur Lehre von der Rassenbildung und ähnlichen Problemen bezeichnet werden könnten. Gut erforscht sind nur die Hefen; über ihre asporogenen Rassen u. a. wird unten zu sprechen sein. — Mutation bei *Rhizopus oryzae* beobachtete SCHOUTEN.[1])

Im nachfolgenden stelle ich eine kleine Auswahl von Kulturrezepten und von Literaturnachweisen zusammen, die sich auf bestimmte Pilzgattungen oder -familien beziehen.

---

1) Reinkulturen aus einer unter d. Mikroskop isolierten Zelle (Zeitschr. f. wiss. Mikr. 1905, **22**, 10).

Saccharomyzeten (Hefen). — Wegen ihrer großen Bedeutung für die Praxis sind die Hefen in den letzten Dezennien mehr als die Vertreter der meisten anderen Pilzgruppen kultiviert und auf dem Wege der künstlichen Kultur nach verschiedenen Gesichtspunkten hin gut erforscht worden. Material für Hefekulturen gewinnt der Anfänger besonders aus obergärigen Bieren oder aus der käuflichen Preßhefe; Hefen lassen sich ferner von süßen Früchten — auch getrockneten (Rosinen) — isolieren, von den Narben und Nektarien der Blüten abimpfen[1]) („Nektarhefen") und aus allerhand gärenden Flüssigkeiten (gärenden Gurken, Sauerkrautbrühe u. a.) gewinnen usw.; biologisch interessante Formen kommen im Schleimfluß der Bäume vor[2]), chromogene Arten (*Torula*-Hefen) lassen sich im Laboratorium aus der Luft auffangen (s. u.). Leicht kultivierbare Formen von Hefen finden sich ferner im Darm sehr vieler Insekten[3]).

Hefen wachsen auf festen wie auf flüssigen Nährböden und beanspruchen dabei außer den allgemein erforderlichen Mineralbestandteilen[4]) (darunter vielleicht auch Ca) Kohlenstoffnahrung in Form von Zuckern oder organischen Säuren (oder deren Salzen) und Stickstoffnahrung in Form von Ammoniumsalzen, Asparagin oder Pepton.[5]) Leicht herstellbare Nährlösungen sind z. B. verdünntes Malzextrakt, Mohrrüben- und Kartoffelextrakte, Hefewasser, Bouillonpeptonlösung oder die von LEBERLE-WILL empfohlene Flüssigkeit[6]):

$CaHPO_4$	0,5	g
K_2HPO_4	4,55	„
$MgSO_4$	2,1	„
Pepton	20	„
Wasser	1 l	

Die Zuckerarten, welche von den Hefen (event. nach Invertierung) verarbeitet werden können, sind für die verschiedenen *Saccharomyces*arten verschieden; für die meisten kommen in erster Linie Glukose und Lävulose (letztere nach Invertierung) in Betracht[7]); auch den mehrwertigen Alkoholen gegenüber verhalten sich verschiedene Arten verschieden. BEYERINCK[8]) unterscheidet:

1) Auch auf vegetativen Pflanzenorganen siedeln sich Hefen an, zumal in den Tropen (KRUYFF, E. DE, Unters. über auf Java einheim. Hefenarten, Zbl. f. Bakt. II, 1908, **21**, 20); über die N-assimilierende *Torula Wiesneri* vgl. ZIKES (s. u.).

2) Literatur z. B. bei ROSE, L., Beitr. z. Kenntnis der Organismen im Eichenschleimfluß (Dissertation, Berlin 1910).

3) Genauere Untersuchung dieser biologisch interessanten Arten wäre sehr erwünscht. — Mit den in Rhynchoten („Pseudovitellus") auftretenden Hefen („*Cicadomyces*" u. a.) sind bisher nur wenige Kulturversuche angestellt worden; vgl. SULČ. K., „Pseudovitellus" u. ähnl. Gewebe d. Homopteren sind Wohnstätten symbiotischer Saccharomyzeten (Sitzungsber. Ges. Wiss. Prag 1910); von späteren Arbeiten namentlich BUCHNER, P., Studien an intrazellularen Symbionten I (Arch. f. Protistenkde. 1912, **26**, 1).

4) Über die Bedeutung des Mg für die Pigmentbildung mancher Hefen s. o.

5) Vgl. auch ARTARI, a. a. O., 1909 (s. o. p. 108 Anm. 2), betrifft *Pichia membranaefaciens*.

6) WILL, Beitr. z. Kenntnis d. Gattung *Mycoderma* (Zbl. f. Bakt. II, 1910, **28**, 1).

7) Eingehende Untersuchungen bei LAURENT, Rech. physiol. s. l. levures (Ann. Soc. belge de Microsc. 1890, **14**, 29); BEYERINCK, *Schizosacch. octosp.* eine achtsporige Alkoholhefe (Zbl. f. Bakt. 1894, **16**, 49); vgl. auch nächste Anm.

8) Üb. Nachweis u. Verbreitung d. Glukose usw. (Zbl. f. Bakt. II, 1895, **1**, 221). B. benutzt die Hefen zum auxanographischen Nachweis verschiedener Enzyme; in der zitierten Arbeit detaillierte Angaben über Herstellung der Auxanogramme.

	es werden assimiliert	nicht assimiliert
1. Glukosehefen (*S. apiculatus* u. a.)	Glukose, Lävulose	Sacch., Lakt., Malt., Dextrin
2. Saccharosehefen (*S. fragrans* u. a.)	Gluk., Läv., Sacch.	Lakt., Malt., Dextrin
3. Maltosehefen (*S. cerevisiae, ellips.* u. a.)	Gluk., Läv., Malt. (z. T. auch Sacch.).	Lakt., Dextrin
4. Laktosehefen (*S. Kefyr, tyrocola* a. u.)	Gluk., Läv., Sacch., Laktose	Maltose, Dextrin
5. Polysaccharosehefen (*S. acetaethyl.*[1]), *Mycoderma sphaeromyces*)	Gluk., Läv., Sacch., Malt., Dextrin	Laktose

Hefewachstum ohne Gärung[2]) erhält man auf N-reichem Nährboden (z. B. ½ % Zucker und 1 % Pepton). Organische N-Verbindungen vermögen nicht den C-Bedarf der Hefen zu decken. — Der Aggregatzustand des Nährbodens ist von Einfluß auf die Art des Hefewachstums. Auf Flüssigkeiten bilden manche Arten schwimmende Häute, andere häufen in ihnen ein Sediment an; über das unterschiedliche Verhalten der als Bodensatzhefe die „Untergärung" durchmachenden Unterhefen und der im Schaum der gärenden Flüssigkeit aufsteigenden, die „Obergärung" bedingenden Oberhefen vergleiche man die Handbücher der Gärungsphysiologie.[3]) Auf festen Nährböden entstehen charakteristische zusammenhängende Kolonien; solche, die nicht von einer Zelle, sondern von vielen sich ableiten (man trage einen Tropfen hefehaltiger Flüssigkeit auf Gelatine auf), erreichen eine ansehnliche Größe; nach Lindner, der sie als Riesenkolonien bezeichnet, kann ihr zuweilen recht charakteristisches Aussehen bei der Bestimmung mancher Arten und Rassen unterstützen.[4]) Gelatine wird im allgemeinen von den Hefen verflüssigt. Eine Reihe von Hefen scheint auch auf N-freien Medien ihr Fortkommen zu finden. Zikes[5]) kultivierte auf (gereinigtem) Agar + 2 % Glukose + 0,02 % KH_2PO_4 eine Reihe von Sproßpilzen (*Willia anomala, W. saturnus,* Mycodermaarten, *Pichia farinosa* und namentlich die auf Laurusblättern gefundene *Torula Wiesneri n. sp.*). — Sauerstoff. Die Bedürfnisse nach Sauerstoff sind bei verschiedenen Hefen ungleich. Gewisse Arten (*S. mycoderma*) sind obligat aërob, *S. cerevisiae* u. a. „temporär" anaërob[6]), indem sie wenigstens eine Zeitlang ohne freien Sauerstoff nicht nur leben, sondern auch sich vermehren können. Zur anaëroben Entwicklung bedürfen die Hefen aber eines vergärbaren

1) Über die Kultur dieser Art vgl. auch 82, Anm. 3.

2) Iwanowski, Üb. d. Entwickl. d. Hefe in Zuckerlösungen ohne Gärung (Zbl. f. Bakt. II, 1903, **10**, 151).

3) z. B. Lafars Handb. d. techn. Mykol., 2. Aufl., Jena 1904 u. ff. Jahre; ferner Lindner, P., siehe nächste Anm.

4) Vgl. Lindner, Mikroskop. Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, 5. Aufl., Berlin 1909, 267, 429.

5) Zikes, H., Über eine den Luftstickstoff assim. Hefe: *Torula Wiesneri* (Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien I, 1909, **108**).

6) z. B. Beyerinck, Üb. d. Butylalkoholgärung u. d. Butylferment (Verh. Akad. Wetensch. Amsterdam 1893, 2. Sect., Deel 1).

Zuckers. Zuckerfreie Nährböden, die bei aërobem Leben die Entwicklung der Hefen zulassen, genügen nicht für anaërobe Existenz.[1]) Gute Durchlüftung der Kulturen fördert das Wachstum. — Konzentration. Die für Hefewachstum vorteilhafte Konzentration der Nährlösungen entspricht einem ca. 5 % Monosaccharidgehalt, doch sind auch höhere Konzentrationen nicht schädlich. WILL gibt an, daß selbst in 76% Malzextrakt noch Hefegärungen möglich seien[2]), und WEHMER[3]) beschrieb eine aus Heringslake gewonnene „Salzhefe", die dem osmotischen Druck einer 24 % NaCl-Lösung widersteht.

Will man Hefekulturen lange aufbewahren, so ist dafür zu sorgen, daß das Austrocknen der Gelatine und ihrer Umwandlungsprodukte langsam vor sich gehe; WILL fand die Temperatur von 5—8 °C und feuchte Luft als günstigste Bedingungen für das Leben der Kulturen.[4])

Sporenbildung willkürlich hervorzurufen, gelang E. CHR. HANSEN.[5]) Seine Versuche zeigen, daß die Hefen durch Nahrungsmangel[6]) zur Sporenbildung geführt werden, daß hohe Temperatur den Vorgang fördert und kräftig vegetierendes Zellenmaterial besonders prompt reagiert. HANSEN kultiviert die Hefen bei Zimmertemperatur in Bierwürze, Most oder in Peptonzuckerlösungen von folgender Zusammensetzung:

Pepton	1 %		Pepton	1 %
Dextrose	5 %	oder	Maltose	5 %
Kaliumphosphat (prim.)	0,3 %		Kaliumphosphat (prim.)	0,3 %
Magnesiumsulfat	0,2 %		Magnesiumsulfat	0,5 %

Man impft von den beiden letzteren Nährlösungen in Bierwürze oder dgl. über, läßt die neue Kultur 24 Stunden bei 25° stehen und sät hiernach das Zellenmaterial auf feuchte Gipsblöcke aus. Bei Luftzutritt und bei einer Temperatur von ca. 25° tritt alsdann Sporenbildung ein. Das Temperaturmaximum liegt für die Sporenbildung tiefer, das Minimum höher als für die Sprossung.[7]) Frisch keimende Sporen können durch Nahrungsentzug sogleich wieder zur Sporenbildung gebracht werden. Wegen technischer Einzelheiten über die Gipsblöcke, die HANSEN in der Form breiter Kegelstümpfe anfertigt, über die Tonwürfel, auf welchen ELION die Hefen zur Sporenbildung bringt, u. a. m. muß die Originalliteratur[8]) verglichen werden. — Nach GORODKOWA kann man *S. cerevisiae* auf zuckerarmem Agar leicht zur Sporenbildung bringen:

---

1) Vgl. CHUDIAKOW, Untersuch. üb. alkoholische Gärung (Landw. Jahrb. 1894, **23**, 391, 489).

2) Vgl. LAFARS zit. Handbuch 1906, **4**, 290.

3) Zur Bakteriologie u. Chemie der Heringslake I (Zbl. f. Bakt. II, 1897, **3**, 209).

4) WILL, H., Beob. üb. d. Lebensdauer von Hefen in Gelatinekulturen (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **31**, 436).

5) Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques II. Les ascospores etc. (C. R. trav. labor. Carlsberg 1883, **2**); Neue Untersuchungen über die Sporenbildung bei den Saccharomyzeten (Zbl. f. Bakt. II, 1899, **5**, 1).

6) Vgl. die von KLEBS gegebene Analyse (Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze III. Allgemeine Betrachtungen. Jahrb. f. wiss. Bot. 1900, **35**, 15, 16; ferner Probl. d. Entwickl. Biol. Zbl. 1904, **24**, 449).

7) Vgl. HANSEN (C. R. Labor. Carlsberg 1902, **5**, 64).

8) z. B. ELION, H., Züchtung von Askosporen auf Tonwürfeln (Zbl. f. Bakt. 1893, **13**, 749); WICHMANN, N., Über d. Askosporenzüchtung auf Ton (ibid. 1893, **14**, 62); BOWHILL, Zur bakteriol. Technik (ibid. II, 1899, **5**, 287).

Agar	1	%
Pepton	1	%
Fleischextrakt . .	1	%
Chlornatrium . .	0,5	%
Glukose	0,25	%.

Bei 28 ° erscheinen die Sporen nach 2—3 Tagen.[1])

Rassenbildung usw. — Das bekannteste, von E. Chr. Hansen[2]) eingehend behandelte Beispiel für eine Mutation im Sinne de Vries'[3]) ist die Ober- und Unterhefe. Die beiden physiologisch wohl unterschiedenen Formen sind insofern nicht selbständig, als die eine aus der andern sich entwickeln kann: in einer Reinkultur der Unterhefeform können sich Oberhefezellen, in einer Reinkultur der Oberhefeform Unterhefezellen bilden; beide Formen können in dem nämlichen Nährsubstrat nebeneinander fortleben und sich vermehren. Ob irgendwelche äußeren Faktoren bei der Entstehung der neuen Form ursächlich beteiligt sind, ist noch gänzlich unklar.

Eine andere Art der Rassenbildung liegt bei der Entstehung asporogener Formen vor, d. h. solcher Zellen, welche die Fähigkeit, Sporen zu bilden, verloren haben. Für die asporogenen Hefen konnte Hansen zeigen, daß die konstant sporenlose Form allmählich aus der typischen hervorgeht, und daß an jeder beliebigen Zelle künstlich sich diese „Transformation" hervorrufen läßt, indem man sie bei hoher Temperatur (zwischen dem Maximum für Sporenbildung und dem für Sprossung) kultiviert.[4]) Hansen erzielte Rassen, die schon seit ca. 17 Jahren asporogen fortgezüchtet werden und sich somit als konstant asporogen erwiesen haben. Die asporogenen Hefen unterscheiden sich von den sporulationsfähigen durch ihren Mangel an Glykogen, ihr Unvermögen, Gelatine zu verflüssigen u. a. m. Über asporogene Rassen von *Schizosaccharomyces octosporus* vgl. Beyerinck.[5])

Wichtige Arten. — Als bekannteste Vertreter der Hefen sind zu nennen *S. cerevisiae* (Bierhefen, zahlreiche Rassen bekannt), den man aus obergärigen Bieren leicht gewinnen kann, *S. ellipsoideus* (Weinhefen), der in gärenden Obst- und Traubenweinen tätig ist, und *S. Pastorianus* mit wurstförmigen Zellen, der in „kranken" Bieren anzutreffen ist. Preßhefe ist überall käuflich zu erhalten. Die Institute für Gärungsgewerbe — z. B. das Berliner (Berlin N 65) — haben Bierhefen der verschiedensten Provenienz in Reinkulturen vorrätig.[6]) Als Bezugsquelle für Weinhefe (*S. ellipsoideus*) ist die kgl. Versuchsanstalt zu Geisenheim a. Rh. zu nennen[7]), in welcher die verschiedensten Formen für Trauben-, Obst- und Schaumweinbereitung vorrätig gehalten werden.

1) Gorodkowa, A. A., Über das Verfahren, rasch die Sporen von Hefenpilzen zu gewinnen (Bull. jard. bot. St. Petersbourg 1909, **8**, 169).

2) Oberhefe und Unterhefe. Studien über Variation und Erblichkeit (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **15**, 353).

3) Die Mutationstheorie, Leipzig 1901.

4) Compt. Rend. Laborat. Carlsberg **5**.

5) Weitere Beob. üb. d. Octosporushefe (Zbl. f. Bakt. II, 1897, **3**, 449).

6) Vgl. besonders Lindner, P., 1909, a. a. O.

7) Vgl. Behrens, J., Die Reinhefe in der Weinbereitung. Ein historischer Rückblick (Zbl. f. Bakt. II, 1897, **3**, 354), daselbst zahlreiche Literaturangaben; Wortmann, Bericht über die Tätigkeit der mit der pflanzenphysiologischen Versuchsstation verbundenen Hefereinzuchtstation (Berichte der Geisenheimer Versuchsanstalt 1898/99); Über einige in den Domänenkellereien zu Ebersbach im Herbst 1896 nach Verwendung von Reinhefe ausgeführte Gärversuche (Weinbau u. Weinhandel 1897, **15**).

S. apiculatus.[1] — Eine durch die Zitronenform der Zellen gekennzeichnete Hefeform, die auf Narben, Nektarien und auf reifen zuckerhaltigen Früchten häufig auftritt. Wächst auf den üblichen Hefenährböden allerdings nur langsam heran. Methoden zur Sporenerzeugung wurden bisher nicht gefunden. Gelatine wird verflüssigt. — Eine merkwürdige Abart fand LINDNER in Schildläusen (*S. apiculatus var. parasiticus*).[2]

S. Mycoderma. — Die in dieser Sammelart vereinigten Hefeformen sind in Bier, Obstweinen usw. weit verbreitet. Man fördert ihre Entwicklung durch Luftzufuhr.[3] Auf flüssigen Nährböden (Würze, Pflaumensaft, Obstweinen usw.) bilden die Mykodermahefen charakteristische Kahmhäute. Über das variable Aussehen der auf festen Böden heranwachsenden „Riesenkolonien" vergleiche man LINDNER und MEISSNER[4]; näheres über die Kolonieform (auch über die „rhizoiden Anhänge", die in die Nährgelatine vordringen) ferner bei HUTCHINSON[5]; vielleicht sind die Mykodermahefen zum Studium der Rassenbildung u. dgl. besonders gut geeignet. — Betr. die Trennung von den Essigsäurebakterien siehe unter diesen.

S. Kefyr. — v. FREUDENREICH[6]) kultiviert sie auf Milchserumgelatine, in Fleischbrühe, Milchzuckerbouillon, in Milch und auf Kartoffeln am besten bei 22°.

S. Ludwigii. — In Schleimflüssen der Bäume gefunden. Über seine Kultur vgl. E. CH. HANSEN.[7]

S. (Torula) glutinis. — Als „Rosahefe" werden seit F. COHN[8] eine Reihe von kleinzelligen, hefeähnlich sprossenden Organismen bezeichnet, die unter dem Sammelnamen *S. glutinis* zusammengefaßt sein mögen. Die Rosahefe tritt spontan auf Stärkekleister, Kartoffeln und vielen anderen Substraten auf. COHN kultivierte sie auf festen (Kartoffeln) und flüssigen Nährböden (weinsaurem Ammonium), sie wächst ebensogut auf den üblichen zuckerhaltigen Gelatinenährböden, oftmals bei Peptonernährung.[9] Über die Riesenkolonien vgl. LINDNER a. a. O.

Schizosaccharomyces octosporus erhält man nach BEYERINCK[10] aus Wasser, in welchem man Korinthen oder Feigen abgewaschen hat. Gelatine wird stark verflüssigt. *Sch.*

1) Als wichtigste Literatur sind die Arbeiten von REESS (a. a. O.) zu nennen, HANSEN (C. R. Labor. Carlsberg **1**) und besonders MÜLLER-THURGAU, *Saccharomyces apiculatus* (in LAFARS Handb. d. Technischen Mykologie **4**, 315).

2) LINDNER, P., Üb. eine in *Aspidiotus Nerii* paras. leb. A.-Hefe (Zbl. f. Bakt. II, 1895, **1**, 782).

3) WINOGRADSKY (Arb. d. Petersburger Naturf. Ges. 1884, **14**, 132) z. B. macht Angaben über den Einfluß der O-Zufuhr auf die Wuchsform der Hefen.

4) LINDNER a. a. O. MEISSNER, Morph. u. Phys. d. Kahmhefen usw. (Landwirtsch. Jahrb. 1901, **30**, 497).

5) Über Form u. Bau der Kolonien niederer Pilze (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **17**, 65).

6) Bakteriol. Unters. über den Kefir (Zbl. f. Bakt. II, **3**, 47); BEYERINCK, Sur le Kéfir (Arch. néerl. sc. exactes et natur. 1889, **23**, 428). „Kefyrkörner" liefern die Apotheken.

7) Über die im Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen (Zbl. f. Bakt. 1889, **5**, 632). Über die Organismen der Schleimflüsse vgl. besonders LUDWIGS Arbeiten (zusammenfassender Bericht im Zbl. f. Bakt. II, 1896, **2**, 337) und ROSES Dissertation (s. o.).

8) COHN, F., Untersuchungen über Bakterien (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1872, **1**, Heft 2, 127, 187).

9) PRINGSHEIM, E., u. BILEWSKY, H., Über Rosahefe (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1910, **10**, 118).

10) Weitere Mitteilungen über die Octosporushefe a. a. O.

octosporus sowie den interessanten *Sch. Pombe* erhält man nach Bergsten[1]) dadurch, daß man asiatische Korinthen mit 10 % Bierwürze + Milchsäure (8—11 % Normalsäure) übergießt und einige Tage bei 35 ° C stehen läßt; sobald Gärung eintritt, gießt man Platten mit Würzeagar.

Mukorazeen. — Auf Pferdemist, der unter einer Glasglocke gehalten wird, auf feuchtem Weißbrot, das der Luftinfektion im Laboratorium ausgesetzt war u. dergl., siedeln sich stets Mukorazeen an (*Mucor mucedo, M. racemosus, M. stolonifer, Pilobolus crystallinus, Thamnidium elegans*). Ihre künstliche Kultur auf sterilem Mist, auf Pflaumensaftnährböden usw. gelingt leicht. Bei Verwendung der Abfälle von Pferden, die vorzugsweise mit Heu ernährt worden sind, kann man auf besonders reichliche *Pilobolus*-vegetation rechnen. Für *Sporodinia* und andere Mukorazeen empfiehlt Brefeld namentlich rohe, geschälte Bananen; der auf *Collybia* parasitierende *Mucor fusiger* wächst vortrefflich auf kalt gewonnenen Auszügen von *Collybia* - Fruchtkörpern.[2]) Kulturen von *Mucor* geben Gelegenheit zur Beobachtung interessanter Parasiten (*Chaetocladium* und *Piptocephalis*); in *Pilobolus* findet man nicht selten den parasitisch lebenden, kleine Gallen erzeugenden *Pleotrachelus*. Über *Mucor racemosus*, die Bedingungen seiner Fortpflanzung, seine anaërobe Entwicklung vgl. Klebs[3]), über *M. stolonifer* Schostakowitsch[4]), über *Thamnidium* Bachmann[5]), über *Sporodinia grandis*, welche auf modernden Hutschwämmen vorkommt, besonders Klebs[6]). Die letztgenannte Form wird dadurch interessant, daß man bei ihr jederzeit leicht Zygosporen erhalten kann; wegen der übrigen genannten Mukorazeen vgl. Blakeslee.[7]) — Der Größe seiner Fruchthyphen wegen wird *Phycomyces nitens* für allerhand physiologische Experimente benutzt und in vielen pflanzenbiologischen Laboratorien auf den üblichen Nährböden[8]) ständig auf Lager gehalten; in der Natur begegnet man ihm selten.

Entomophthorazeen. — *Empusa* wurde von Brefeld (s. u.) zuerst in Kultur genommen. Sheldon kultivierte sie auf Bouillonagar.[9]) Raciborski[10]) sah *Empusa* auf Peptonagar wachsen, wenn neben der Aussaat eine sterilisierte Fliegenleiche lag.

Basidiobolus ranarum ist aus dem Darm der Frösche meist leicht zu isolieren. Raciborski[11]) kultivierte den Pilz auf verschiedenen Substraten; seine Züchtung macht

---

1) Wochenschr. f. Brauerei, **24**, Nr. 8. 2) Brefeld s. u. S. 50 Anm. 5 (Heft 14).

3) Beding. d. Fortpfl. bei einigen Algen u. Pilzen, Jena 1896.

4) Einige Versuche über die Abhängigkeit d. *M. prol.* v. d. äuß. Beding. (Flora 1897, **84**, 88).

5) Einfl. d. äuß. Beding. auf die Sporenbildung v. *Thamnidium elegans* (Bot. Zeitg. 1895, **53**, I, 107).

6) Zur Physiol. d. Fortpfl. einiger Pilze. I. *Sporodinia grandis* (Jahrb. f. wiss. Bot. 1898, **32**, 1).

7) Besonders: Sexual reproduction in the Mucorineae (Proc. Americ. Acad. of Arts and Sci. 1904, **40**, 205). Über ringförmige Anordnung der Zygosporen, über eine durch Kultur erhaltene asporogene Rasse (*Zygorrhynchus Vuilleminii*), über den Einfluß der Ernährung auf Zygosporenbildung u. a. vgl. Namyslowski, B., Studien über Mukorazeen (Bull. intern. Acad. Sc. Cracovie, Cl. des sc. math. et nat., Ser. B., Sc. nat. 1910, 477).

8) Einige Ratschläge bei Wevre, A. de, Rech. expér. s. l. *Ph. nit.* Kunze (Rec. inst. bot. Bruxelles 1908, **4**, 155), vgl. auch oben S. 134.

9) Cultures of *E* (Journ. appl. Microsc. 1903, **6**, 2212).

10) Üb. Schrittwachst. d. Zelle (Bull. Acad. Sc. Cracovie 1907, 898).

11) Üb. d. Einfl. äußerer Beding. auf die Wachstumsweise des *Basidiob. ranarum* (Flora 1896, **82**, 107).

keinerlei Schwierigkeiten. Besonders üppig ist das Wachstum in Peptonlösung; unter dem Einfluß bestimmter Substanzen (Zucker u. a.) sah RACIBORSKI ein auffälliges Palmellastadium zustande kommen. Auch Zygosporen sind in künstlichen Kulturen oft anzutreffen.

Chytridiazeen. — Das in Tümpeln und Gräben weit verbreitete *Rhizophidium pollinis* fängt man ein, indem man frischen oder getrockneten Pinuspollen auf das Wasser, in dem man Zoosporen vermutet, aufstreut. 2—3 Tage nach dem Ausstreuen sind die Pollenkörner zum Untersuchen fertig. Auch *Rh. sphaerotheca* wächst gut auf demselben Substrat.[1])

Monoblepharideen. — Morphologisch interessante Wasserbewohner, die für selten gelten, indessen doch ziemlich verbreitet zu sein scheinen.[2]) LAGERHEIM[3]) konnte verschiedene Formen aus Zweigstücken, die mit Flechten oder Pyrenomyzeten besetzt waren und den Winter über in Wasser gelegen hatten, sich entwickeln sehen. WORONIN[4]) kultivierte sie, indem er Zweige von *Alnus* u. dgl., Koniferennadeln oder -Zapfen in Schalen mit Wasser brachte; binnen 3—8 Tagen entwickelten sich auf den genannten Objekten neben anderen Pilzen auch Monoblepharideen.

Saprolegniazeen. — *Achlya*- und *Saprolegnia*-Arten sind fast immer leicht dadurch zu erhalten, daß man in Leitungs- oder Sumpfwasser tote Fliegen, Stücke von Mehlwürmern, Ameiseneier u. dgl. einlegt. Nimmt man unverletzte Fliegenleichen, so gelingt es, die gleichzeitige Entwicklung von Bakterien einzuschränken. Auf die im Wasser vorhandenen Zoosporen wirken die genannten Objekte stark anziehend. Schon vor Ablauf der ersten Woche sieht man an der Fliege usw. ein kräftiges Saprolegniazeenmyzel sich entwickeln.[5]) Zum Zweck der Isolierung verfährt HORN[6]) in der Weise, daß er ein Myzelstückchen auf Peptonagar (1 % Agar, 1 % Pepton) überträgt; auf diesem füllt das schnell wachsende Myzel bald ansehnliche Flächen aus; die äußersten Enden des Myzels liegen bakterienfrei vor, so daß man durch ihre Übertragung auf neue Nährböden reine Kulturen gewinnen kann; besonders empfehlenswert ist Dekokt von gelben Erbsen (auf 20 ccm je 1 Erbse). Gegen Säuren sind Saprolegnien äußerst empfindlich (s. o.). Angaben über den Einfluß äußerer Bedingungen auf die Form der Hyphen, Querwandbildung, die

1) ZOPF, Über einige niedere Algenpilze 1887, MÜLLER, FR., Unters. üb. d. chemotaktische Reizbarkeit der Zoosporen v. Chytridiazeen u. Saprolegniazeen (Jahrb. f. wiss. Bot. 1911, **49**, 421).

2) CORNU, Monographie des Saprolegniées 1872; MINDEN, Über Saprolegniineen (Zbl. f. Bakt. II, 1902, **8**, 805).

3) Mykol. Studien II, Untersuch. über die M. (Bih. till K. Svenska Vet. Akad. Handl. **25**, Afd. III, Nr. 8).

4) Beitr. z. Kenntn. d. M. (Mém. Acad. imp. Sc. St. Petersbourg 1904, Sér. VIII, Cl. phys.-math. **16**, 1, vgl. Bot. Zeitg. 1906, **64**, 81).

5) DE BARY, Spezies der Saprolegnieen (Bot. Zeitg. 1888, **42**, 597); MAURIZIO, A., Studien über Saprolegnieen (Flora 1896, **82**, 14); SCHOUTEN, S. L., A pure culture of Saprolegniaceae (K. Akad. Wetensch. Amsterdam 1901, 601, auch Reinkulturen mit een onder het mikroskoop geïsoleerde cell. Utrecht 1901); MINDEN, Üb. Saprolegniineen (Zbl. f. Bakt. II, 1902, **8**, 805). CLAUSSEN, P., Üb. Eientwickl. u. Befrucht. bei *Saprolegnia monoica* (Ber. d. D. Bot. Ges. 1908, **26**, 144). MÜCKE, M., Z. Kenntn. d. Eientw. u. Befr. von *Achlya polyandra* DE BARY (ibid. 1908, **26**a, 367).

6) Experimentelle Entwicklungsänderungen bei *Achlya polyandra* DE BARY (Diss., Halle 1904; auch Ann. Mycol. 1904, **2**, 207). S. auch OBEL, P., Res. on the condition of the forming of oogonia in *Achlya* (Ann. Mycol. 1910, **8**, 421).

Fruktifikation usw. finden sich namentlich bei KLEBS[1]) und HORN (a. a. O.). Über *Aphanomyces* vgl. ROTHERT.[2])

Peronosporazeen. — *Phytophthora infestans* wächst nach BREFELD[3]) bei künstlicher Ernährung (kalt gewonnenes Extrakt aus getrockneten Scheiben junger Kartoffelknollen, event. + Bierwürze) „wie Unkraut, fast so üppig wie sie auf den Kartoffeln wächst". Diese sowie die Mitteilungen MATRUCHOTS und MOLLIARDS, welche *Phytophthora* auf lebenden Kartoffelstücken und einem nicht näher genannten künstlichen Nährboden erfolgreich kultivierten[4]), bedürfen erneuter Prüfung und Ergänzung.

Zahlreiche Beiträge zur Kenntnis der **höheren Pilze** (Askomyzeten, Basidiomyzeten einschl. Uredineen und Ustilagineen) verdanken wir BREFELD[5]), der Vertreter aller Gruppen auf künstlichem Substrat kultiviert hat, freilich insofern mit wechselndem Erfolg, als er bei vielen Pilzen nur die einfache Fruktifikationsform der Konidienbildung an den kultivierten Exemplaren eintreten sah und bei andern nur steriles Myzel zu erzielen vermochte. Besonders zu betonen ist, daß BREFELD nicht nur Saprophyten, sondern auch typische Pflanzenparasiten auf künstlichen Substraten zu züchten vermochte.

Exoaszeen. — BREFELD (a. a. O. Heft 9, 142) erzog in künstlichen Nährlösungen aus Askosporenhefen weiteres Hefenmaterial, aber kein Myzel (*Taphrina rhizophora, Exoascus deformans*).

Ascoidea rubescens, vgl. BREFELD a. a. O. 94. KLEBS[6]) kultivierte den Pilz auf Pflaumensaft, Agar u. a. (Konidien- und Askusbildung).

Perisporieen.[7]) — *Penicillium* und *Aspergillus* sind artenreiche und weitverbreitete Gattungen der Perisporieen, die sich leicht kultivieren lassen und überdies als Verunreiniger der Pilzkulturen eine große Rolle spielen. *Penicillium glaucum*, eine sehr formenreiche Sammelspezies[8]), ist in der Laboratoriumsluft überall vorhanden und wächst auf feuchtem Weißbrot, Früchten und auf allerhand künstlichen Nährböden. Näheres über Morphologie

1) Zur Phys. d. Fortpfl. einiger Pilze II. *Saprolegnia mixta* (Jahrb. f. wiss. Bot. 1899, **33**, 513).

2) Die Sporenentwicklung bei A. (Flora 1903, **92**, 293).

3) Botan. Unters. über Hefenpilze. Leipzig 1883, 5. Heft, 10; ferner 14. Heft desselben Werkes, 1908, 41.

4) Sur la culture pure du *Ph. infestans* DE BARY, agent de la maladie de la pomme de terre (Bull. Soc. myc. France 1900, **16**, 209).

5) Bot. Unters. über Schimmelpilze 2. Heft, Leipzig 1874 (behandelt *Penicillium*); 3. Heft, Leipzig 1877 (behandelt *Coprinus, Amanita, Agaricus*, Gasteromyzeten, Clavarieen, Tremellineen); 4. Heft, Leipzig 1881 (Verschiedene Phykomyzeten und Askomyzeten); 5. Heft, Leipzig 1883, Bot. Unters. über Hefenpilze (Ustilagineen); 6. Heft, Leipzig 1884, Bot. Unters. üb. Myxom. u. Entomophth. (Myxomyzeten, *Conidiobolus*); 7. Heft, Unters. aus d. Gesamtgebiet d. Mykol., Leipzig 1888 (Pilakreen, Aurikularieen, Tremellineen, Dakryomyzeten); 8. Heft, Leipzig 1889 (Tomentelleen, Thelephoreen, Hydneen, Agarizineen, Polyporeen); 9. Heft, Münster 1891 (Hemiasci, Exoasci); 10. Heft, Münster 1891 (Pyrenomyzeten, Hysteriazeen, Diskomyzeten); 11. u. 12. Heft, Münster 1895 (Ustilagineen); ferner 14. Heft, Münster 1908 (Kultur der Pilze).

6) Zur Physiologie d. Fortpflanz. einiger Pilze III (Jahrb. f. wiss. Bot. 1900, **35**, 92, 98).

7) Ausführliche Mitteilungen über die nachfolgend genannten Gattungen bei WEHMER in LAFARS Handb. d. techn. Mykol., Jena 1906, **4**, 192ff.

8) Vgl. THOMS, CH., Culture studies of species of *Penicillium* (Departm. of Agric. B. of Anim. Ind., Bull. No. 118, Washington 1910).

und Entwicklung, insbesondere auch über die selten beobachteten Perithezien bei BREFELD[1]), welcher solche nach Aussaat auf ungesäuertem grobem, allerdings nicht sterilisiertem Brot erhielt, das gut anschließend auf eine Glasplatte aufgelegt wurde: nach 6 Tagen bedeckt man die Kultur mit einer zweiten Glasplatte, an der alsbald die Fruchtkörper wahrnehmbar werden. Wie WÄCHTER gezeigt hat, sind manche Arten aus dem Formenkreise des *P. glaucum* befähigt, Koremien, d. h. bäumchenähnliche Gebilde mit weißlichem Stiel und grünem sporentragendem Kopf zu bilden[2]). Anwendung sehr verdünnter Nährlösungen und Kultur auf Äpfeln ist für die Bildung von Koremien förderlich. — Mit *P. glaucum* oft verwechselt wird das in Laboratorien ebenfalls weit verbreitete *P. luteum*, das auf denselben Substraten, auch auf Zitronenscheiben, Dattelextrakt usw. sehr häufig auftritt; der sterile Myzelrand fällt durch seine gelbe Färbung auf. Perithezien häufig; „Neigung" zur Koremienbildung. Andere *P.*-Arten treten auf faulenden Südfrüchten auf (*P. italicum*, *P. olivaceum*). Über *P. brevicaule* s. o. 93; über Kultur von *Penicillium* auf Holz (Produktion von Hadromase) vgl. CZAPEK.[3]) — *Aspergillus*-Arten lassen sich ebenfalls aus der Laboratoriumsluft auffangen und als verbreitete Saprophyten leicht auffinden. *A. glaucus* (*Eurotium herbariorum*, *E. repens*) findet sich auf allerhand modernden organischen Stoffen, auf Schwarzbrot, auf eingemachten Preißelbeeren u. a.[4]); Konidien grün, die häufigen Perithezien goldgelb; sie entstehen[5]) z. B. auf Brot jederzeit, wenn man die Kulturen bei einer Temperatur von 28—29° hält. *A. niger* (verzweigte Sterigmen!, identisch mit *Sterigmatocystis nigra*) ist zeitweilig in Laboratorien häufig; er bevorzugt saure Nährböden und hat ein hohes Temperaturoptimum (40°); man kann ihn gewöhnlich leicht erhalten, wenn man Galläpfelinfuse im Thermostaten hält. *A. flavus* und *A. fumigatus*, jener mit gelben, dieser mit grünen Konidiendecken, haben ebenfalls hohes Temperaturoptimum. — *Citromyces Pfefferianus* (Angaben über seine Morphologie bei WEHMER a. a. O.) siedelt sich auf sauren Böden wie Zitronensaft an; Zucker wird von ihm in freie Zitronensäure umgesetzt.

Tuberazeen. — Die Trüffelpilze sind insbesondere auf ihre Keimung hin schon wiederholt untersucht worden, doch leider oft in unzulänglicher und unwissenschaftlicher Art.[6]) Neuerdings beschäftigte sich auch MATRUCHOT mit *Tuber melanosporum* und *T. uncinatum* (Myzelkultur, Sklerotiumbildung auf Kartoffel plus Nährlösung).[7])

Pezizazeen. — Viele Vertreter dieser Familie haben sich künstlicher Züchtung zugänglich gezeigt.[8]) *Sclerotinia sclerotiorum* ist seit DE BARY[9]) auf Mohrrüben, auf künst-

---

1) Bot. Unters. über Schimmelpilze, 2. Heft, Münster 1874, 41. Ferner von demselben Werk 14. Heft, 1908, 60.

2) WÄCHTER, W., Üb. d. Koremien des *Penic glaucum* (Jahrb. f. wiss. Bot. 1910, **48**, 521); vgl. auch FISCHER, H., Über *Coremium arbuscula* n. sp. (Ber. d. D. B. Ges., 1909, **27**, 502).

3) Z. Biol. d. holzbewohn. Pilze (Ber. d. D. Bot. Ges. 1899, **17**, 166).

4) Systematische Analyse der zum Formenkreis der *A. glaucus* gehörigen Pilze bei MANGIN, L., Qu'est-ce que l'*Asp. gl.* etc.? (Ann. Sc. nat. Bot. II, sér. IX, **10**, 303).

5) Vgl. KLEBS, G., Bedingung d. Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen, Jena 1896, 477ff.

6) GREMONT DE LESPARRE in C. R. Acad. Sc. Paris 1898; BOULANGER, Les mycelium truffiers blancs, Rennes-Paris 1903; Germination de l'ascospore de la truffe, ibid.

7) S. la culture artific. de la truffe (Bull. Soc. Mycol. **19**, 267).

8) Vgl. BREFELD, Untersuch. aus d. Gesamtgebiet d. Mykol. Heft 4, 9 u. 10.

9) Über einige Sklerotinien u. Sklerotienkrankheiten (Bot. Zeitg. 1886, **40**, 377). Vgl. BREFELD a. a. O. 4. Heft, 112.

lichen Substraten (Pflaumensaftagar usw.) oft kultiviert worden: man infiziert mit einem Stückchen des Sklerotium die Nährböden, auf welchen nach 8—14 Tagen neue Sklerotien in Hexenringen zur Ausbildung kommen. Sklerotien in feuchten Sand gelegt bilden nach einigen Monaten Apothezien.

Pyronema confluens ist auf sterilisierter Erde leicht zu kultivieren: man streut auf der im Autoklaven (7 Atm.) behandelten Erde Sporen aus, bedeckt den Topf mit einem Glas und stellt ihn an einen warmen, hellen Platz. Nach 6—7 Tagen erscheinen die Fruchtkörper[1]). Auch auf Gelatine und Agar läßt sich *P.* leicht kultivieren. CLAUSSEN setzt in eine Petrischale ein kleines Glasgefäß, füllt dieses bis zum Rand mit Agar von folgender Zusammensetzung:

Agar	2 %
Inulin puriss.	2 %
KH_2PO_4	0,05 %
NH_4NO_3	0,05 %
$MgSO_4$	0,02 %
$Fe_3(PO_4)_2$	0,001%
H_2O	95 %

und den freibleibenden Raum der Petrischale mit demselben, aber inulinfreiem Agar bis zu gleicher Höhe. In der Mitte wird *P.* (Sporen oder Myzel) ausgesät; nach wenigen Tagen fruktifiziert er auf dem inulinfreien Teil des Substrats sehr reichlich.

Ascobolus findet man z. B. auf Pferdemist; er läßt sich auf den üblichen Pilznährböden kultivieren.[2]) Über *Ascophanus* vgl. CH. TERNETZ, über *Boudiera* CLAUSSEN, über *Thelebolus* RAMLOW.[3]) — *Botrytis cinerea* wächst auf den üblichen Nährböden; wenn man Blätter von Kräutern einige Tage unter der Glasglocke hält, kann man mit Bestimmtheit auf die Entwicklung des Pilzes rechnen.

Hysteriazeen. — *Lophodermium pinastri* (Schüttepilz) wächst auf verschiedenen Nährböden, auf Nährgelatine, auf sterilisierten Nadeln verschiedener Kieferarten (*Pinus silvestris, P. strobus*), zuweilen auf Brot mit Pflaumendekokt oder Kiefernholz.[4])

Sphaeriazeen. — Arten von *Sordaria* und *Chaetomium*[5]) sind auf Mist, auf faulenden Pflanzenteilen u. dgl. anzutreffen und sind zumeist auf den üblichen Nährböden leicht zu kultivieren (auf Mist, Mistdekokt, Viciastengeln mit Agar, auf Pflaumensaft usw.). Vgl. besonders BREFELD, 9. Heft, 31.

---

1) KOSAROFF, P., Beitr. z. Biol. von *Pyr. confl.* (Arb. Kaiserl. Biol. Anst. f. Land- u. Forstwirtsch. 1906, **5**, 126); CLAUSSEN, P., Zur Entwicklungsgeschichte der Askomyzeten *Pyr. confl.* (Ztschr. f. Bot. 1912, **4**, 1). Vgl. auch SCHMIDT, E. W., *Oedocephalum glomerulosum* HARZ, Nebenfruchtform zu *Pyronema omphalodes* (BULL.) FCKL. (Zbl. f. Bakt. 1910, II, **25**, 80).

2) Über den Einfluß der Bakterien s. o. 140.

3) TERNETZ, CH., Protoplasmabewegung u. Fruchtkörperbildung bei *Ascophanus carneus* (Jahrb. f. wiss. Bot. 1900, **35**, 273); CLAUSSEN, Z. Entwicklungsgesch. d. Askomyzeten, *Boudiera* (Bot. Ztg. 1905, **63**, I, 1); RAMLOW, Z. Entwicklungsgesch. v. *Th. stercoreus* (ibid. 1906, **64**, I, 85).

4) TUBEUF, Kultur parasitischer Hysteriazeen (Naturwiss. Zeitschr. f. Land- u. Forstwirtsch. 1910, **8**, 408).

5) ZOPF, W., Zur Entwicklungsgeschichte der Askomyzeten (*Chaetomium*) (Nova acta 1881, **42**, Nr. 5); OLTMANNS, Üb. d. Entwickl. d. Perithezien in der Gattung *Ch.* (Bot. Zeitg. 1887, **45**, 193).

Xylaria hypoxylon sowie die in Gewächshäusern nicht seltene tropische *X. Cookei* kultivierte MOLISCH[1]) auf Pflaumensaft, auf Brot u. a.

Hypokreazeen. — Am eingehendsten auf dem Wege künstlicher Kulturen erforscht ist *Nectria*, mit der sich BREFELD (a. a. O. 10. Heft) und WERNER[2]) beschäftigt haben. Letzterer kultivierte den Pilz erfolgreich auf flüssigen und festen Nährböden (Pflaumensaft, Agar, Kartoffeln, Brot, Kastanien usw.). Über *Polystigma rubrum* und die Keimung seiner Spermatien vgl. BREFELD (a. a. O. 9. Heft, 31). Derselbe Forscher brachte *Claviceps purpurea* auf künstlichen Nährböden zur kräftigen Myzel- und Konidienbildung (*Sphacelia*-Form); Sklerotien wurden niemals beobachtet (a. a. O. 8. Heft, 16).

Uredineen. — Alle Sporenformen lassen sich auf künstlichen Substraten zur Keimung bringen. Lebensfähige Kulturen sind jedoch noch nie erzielt worden.

Ustilagineen. — Besonders BREFELD (a. a. O. 5., 11., 12. Heft) hat gezeigt, daß die Sporen der Ustilagineen nicht nur in künstlichen Nährlösungen keimen, sondern daß sich in diesen die Zellen der Brandpilze in Form von Hefen unbeschränkt vermehren können. Pflaumensaft und ähnliche Lösungen eignen sich zur Kultur der Brandpilzhefe. *Ustilago Jensenii* geht in Kulturen zu normaler Myzelbildung über, wenn eine besonders sauerstoffreiche Atmosphäre ihm geboten wird, und der Nährboden alkalische Reaktion hat.[3]) Sporenbildung konnte in künstlichen Kulturen bisher niemals mit Sicherheit beobachtet werden.

Tremellineen, Aurikularieen. — Einige Angaben bei BREFELD (a. a. O. 7. Heft). *Pilacre Petersii* wurde bis zur Fruchtbildung namentlich auf Buchenholzsägespänen und Bierwürze kultiviert (BREFELD, a. a. O. 14. Heft).

Exobasidieen. — BREFELD kultivierte *E. Vaccinii* auf künstlicher Nährlösung bis zur Konidienbildung (a. a. O. 8. Heft).

Telephoreen. — Von *Stereum* erhielt BREFELD (ibid.) auf künstlichen Nährböden nur steriles Myzel; *Coniophora cerebella* bildet auf festen Nährböden von der üblichen Zusammensetzung[4]), auf Holz u. a. reichliches Myzel; *Cyphella* wurde von MOLLIARD[5]) kultiviert.

Klavarieen. — Einige Angaben bei BREFELD (a. a. O. 3. Heft).

Hydneen. — BREFELD (a. a. O.) konnte nur einige von ihnen zur Keimung bringen, und auch von diesen nur steriles Myzel züchten. Bis zur Fruchtbildung kamen DUGGARS Kulturen (s. u.) von *Hydnum coralloides*.

Agarizeen. — BREFELD (a. a. O.) brachte die Angehörigen zahlreicher Gattungen auf seinen Nährlösungen zur Keimung, Myzel- und Oidienbildung, viele sogar zur Fruchtbil-

---

1) Leuchtende Pflanzen, 2. Aufl. Jena 1912, 43ff. Vgl. ferner HARDER, R., Beitr. z. Kenntn. v. *Xylaria hypoxylon* (Naturwiss. Ztbl. f. Forst- u. Landw. 1909, **7**, No. 8); FREEMAN, D. L., Unters. ü. d. Stromabildung der *Xyl. hyp.* in künstl. Kult. (Ann. Mycol. 1910. **8**, 192).

2) Die Beding. d. Konidienbildung bei einigen Pilzen. Dissertation, Basel 1898.

3) HILS, E., Ursachen der Myzelbildung bei *Ustilago Jensenii* (ROSTR.) Diss. Tübingen 1912.

4) Vgl. z. B. HARDER a. a. O., WEHMER, Hausschwammstudien (Mykol. Zbl. 1912, **1**, 2). Hier wird auch über die Fähigkeit des Pilzes, die Wattestöpsel seiner Kulturen zu durchwachsen und durch die Stöpsel benachbarter fremder Kulturen in diese einzudringen, berichtet.

5) Observ. s. le *Cyphella ampla* LEV. obtenu en culture pure (Bull. Soc. myc. France 1903, 146).

dung. Besonders gut kultivierbar sind die mistbewohnenden Coprinusarten[1]): *C. ephemerus, ephemeroides, lagopus, plicatilis, stercorarius* u. a., die auf sterilisiertem Pferdemist, Kuhfladen, Mistdekokt + Agar nach Aussaat von Sporen oder kleinen Myzelteilen sich schnell entwickeln. Sklerotien bringt man auf feuchtem Sand unter eine Glasglocke. *Agaricus melleus* (Hallimasch) kam in MOLISCH' Kulturen[2]) bis zur Fruchtkörperbildung; MOLISCH säte in Erlenmeyer-Kolben auf Brot aus und sah jedesmal Fruchtkörperbildung eintreten, wenn das Substrat nach üppiger Entwicklung der Rhizomorphen allmählich an Feuchtigkeitsgehalt verlor, ohne vollständig einzutrocknen. Parasitisch lebende Arten der Gattung *Nyctalis* kultivierte BREFELD auf kalt gewonnenem *Russula*-Extrakt und Bierwürze bis zur Anlage von Fruchtkörpern. — Speziell bei der Kultur von Agarizeen erzielten FERGUSON und DUGGAR gute Erfolge mit der „tissue culture method" (s. o. 133); DUGGAR züchtete verschiedene Agaricusarten (*A. campestris* u. a.), *Coprinus, Pleurotus* usw. bis zur Fruchtbildung.

Weitere Mitteilungen über Kultur von Angehörigen des *Pleurotus-, Tricholoma-, Collybia*-Kreises u. a. finden sich noch mehrfach in der Literatur.[3]) — Über die Anlage von Champignonkulturen im gärtnerischen Sinn und die Behandlung von Champignonbrut liegt reichliche Literatur vor.[4])

Polyporeen. — BREFELD (a. a. O.) brachte *Merulius-, Daedalea-, Trametes-, Polyporus*arten u. a. zur Keimung und Myzelbildung und beobachtete Oidien- und Chlamydosporenproduktion. *Fistulina hepatica* wächst (nach BREFELD, a. a. O., H. 14) vortrefflich auf Nährlösungen, die aus Fruchtkörpern der gleichen Spezies hergestellt sind. DUGGAR (a. a. O.) brachte *Daedalea* bis zur Fruchtbildung. Großes praktisches Interesse beanspruchen die Versuche, *Merulius lacrymans* (Hausschwamm) künstlich zu kultivieren. POLECK[5]) war der erste, der künstliche Kulturen vom Hausschwamm anlegte (Aussaat von Sporen auf Holzscheiben). Auf künstlichen Nährlösungen erzielte v. TUBEUF[6]) schöne Kulturen: zu 50 g folgender Lösung

1000	g	Wasser
10	„	Ammoniumnitrat
5	„	Kaliumphosphat
1	„	Magnesiumsulfat
2	„	Milchsäure

1) Vgl. außer BREFELD noch HANSEN, E. CHR., Biolog. Untersuch. über Mist bewohnende Pilze (Bot. Ztg. 1897, **55**, 111): FALCK, Die Kultur d. Oidien und ihre Rückführung in die höhere Fruchtform bei den Basidiomyzeten (COHNS Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1902, **8**, 307).

2) Leuchtende Pflanzen, 2. Aufl. Jena 1912, 40.

3) z. B. COSTANTIN u. MATRUCHOT, Culture d'un champignon lignicole (C. R. Acad. Sc. Paris 1894, **119**, 752; daselbst auch einige historische Daten); MATRUCHOT, Rech. biol. s. l. champ. (Rev. gén. de Bot. 1897, **9**, 81) u. v. a.

4) Vgl. z. B. WENDISCH, Die Champignonkultur in ihrem ganzen Umfange. 3. Aufl., Berlin 1905; GRÜN, Der Champignon und seine Kultur, Erfurt 1899 u. a.

5) Vgl. MÖLLERS Arbeit (s. Anm. 6).

6) Beitr. z. Kenntn. d. Hausschwamms *Merulius lacrymans* (Zbl. f. Bakt., II, 1902, **9**, 127). Über gelungene Kulturversuche des Hausschwammes (*M. lacrym.*) aus seinen Sporen (Hedwigia 1903, **42**, [6]). Weitere Literatur: MALENKOVIČ, B., Mit d. Sporenkeimung zusammenhängende Versuche mit Hausschwamm (Naturwiss. Zeitschr. f. Land- u. Forstwirtsch. 1904, **2**, 100). MÖLLER, A., Hausschwammforschungen, Jena 1907, fg. MEZ, C., Der Hausschwamm. Dresden 1908; WEHMER, C., Hausschwammstudien (Mykol. Zbl. 1912, **1**, 2 ff.).

wurden 10 g Filtrierpapier gegeben; der Pilz verwertet die Zellulose des letzteren. Außerdem legte TUBEUF Kulturen mit

1000	g	Wasser
25	„	Malzextrakt oder Fleischextrakt
10	„	Zitronensäure
60	„	Gelatine

an. Wie alle holzzerstörenden Pilze bevorzugt auch *Merulius* feste Nährböden. In den üblichen kleinen Kulturgefäßen bildet er keine Fruchtkörper[1]), wohl aber auf Holz, das man in großen feuchten Kammern zu halten hat. Mit *Boletus*-Arten und ähnlichen sind bisher noch keine positiven Kulturresultate zu gewinnen gewesen.

Gasteromyzeten. — Angaben über Nidulariazeen machte BREFELD (a. a. O. 3. Heft). *Cyathus striatus* und *Crucibulum vulgare* kultivierte EIDAM[2]) auf Pferdemistdekokt u. dgl. bis zur Myzelbildung, ersteren sogar bis zur Anlage der Fruchtkörper. Relativ leicht kultivierbar ist *Sphaerobolus stellatus*, der schon oft in Gewächshäusern an Orchideenkästen usw. beobachtet worden ist. ED. FISCHER[3]) kultivierte ihn auf ausgekochtem Sägemehl; ein mit diesem gefüllter Blumentopf wurde in Wasser gestellt, so daß das Substrat immer hinreichend feucht blieb. DUGGAR[4]) kultivierte ein *Lycoperdon* bis zur Fruchtkörperbildung.

Flechten. — Mit der Kultur der flechtenbildenden Pilze hat sich zuerst A. MÖLLER beschäftigt.[5]) Es gelang ihm, auf geeigneten Nährlösungen Flechtenpilze ohne Algen zur Entwicklung zu bringen und selbst Spermatien (*Collema*) keimen zu sehen. TOBLER kultivierte *Xanthoria parietina, Parmelia acetabulum. Pertusaria vulgaris* u. a. m. und arbeitete mit festen Kultursubstraten: Pappelborkeextrakt und Bierwürze (3%)-Gelatine bezw. -Agar, Tontellerchen, die mit Erde eingerieben und sterilisiert worden waren, Blumenerde, die beim Sterilisieren eine das Flechtenwachstum begünstigende harte Oberflächenkruste bildete. TOBLER ging von Askosporen, Soredien und Thallusstücken aus; die biologische Synthese der Flechte gelang, wenn die Pilze auf Bierwürzegelatine oder -agar kultiviert und dann zugleich mit Algenmaterial auf Schiefer- oder Tonstückchen übertragen wurden.[6])

Fungi imperfecti. — Für die imperfekten Pilze muß an dieser Stelle noch mehr als bei den früheren Gruppen eine beschränkte Auswahl genügen. *Oidium lactis*, der „Milchschimmel", ist jederzeit auf saurer geronnener Milch leicht zu erhalten; auf feucht

1) Über eine Ausnahme berichtet R. HARDER (Naturwiss. Ztschr. f. Land- u. Forstwirtsch. 1909, **7**, 428).

2) Die Keimung der Sporen u. die Entstehung d. Fruchtkörper bei den Nidularieen (COHNS Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1877, **3**, 2. Heft, 221).

3) Z. Entwicklungsgesch. d. Gasteromyzeten (Bot. Zeitg. 1884, **42**, 433).

4) The principles of mushroom growing and mushr. spawn making (Bur. Plant. Industr. Bull. Nr. 85, Washington 1905).

5) Kultur der flechtenbildenden Askomyzeten ohne Algen (Dissertation, Münster i. W. 1887); Über die sogen. Spermatien der Askomyzeten (Bot. Zeitg. 1888, **46**, 421). Von älteren s. BORNET, Rech. s. les gonidies des lichens (Ann. sc. nat., Bot. V sér., **17**, 1873) u. TREUB, M., Lichenenkultur (Bot. Ztg. 1873, **31**, 721).

6) TOBLER, F., Das physiol. Gleichgewicht v. Pilz u. Alge in d. Flechten (Ber. d. D. B. Ges. 1909, **27**, 421), Z. Ernährungsphys. d. Fl. (ibid. 1911, **29**, 3), Z. Biol. v. Fl. u. Flechtenpilzen I, II (Jahrb. f. wiss. Bot. 1911, **49**, 389).

gehaltenen Klumpen von Preßhefe bildet er oft dichte Überzüge; außerdem treffen wir ihn in der Butter, auf sauren Gurken usw.[1]) Seine Kultur gelingt leicht[2]); es verschmäht übrigens als N-Quelle Nitrate und Nitrite und bevorzugt Ammonsalze und Harnstoff. Rohrzucker, Maltose und Milchzucker sind als C-Quelle untauglich, brauchbar sind Glukose, Lävulose, Acetate, Propionate, Butyrate.[3])

Fusarium und andere Pilze kultivierten APPEL und WOLLENWEBER auf gekochten Vegetabilien bis zur höheren Fruktifikationsform. *Fusarium* entwickelte seine Sporen besonders gut auf Stengeln von Kartoffel, Lupine, Pferdebohne usf.; die Farbstoffe, besonders die der plektenchymatischen Myzele traten auf Knollen besonders deutlich hervor.[4])

Fusarium aquaeductuum, der an seinem Moschusgeruch und seinen mondsichelähnlichen Konidien („Selenosporium"!) kenntliche „Moschuspilz", wurde von KITASATO u. a.[5]) kultiviert. Der Pilz wächst auf Heuinfus, Bouillon, Gelatine, Agar, Kartoffeln, Reis, Brot usw. usw. Auf den letztgenannten stärkehaltigen Böden bildet er ein rötliches Myzel, das nach KITASATO binnen kurzer Zeit ziegelrot wird. Besonders rein ist der Moschusgeruch in Bouillon und in Getreideinfusen (Weizen, Hafer, Roggen).

Mykorrhiza. — Isolierung und Kultur der Mykorrhizapilze sind in der neuesten Zeit von verschiedenen Autoren erfolgreich in Angriff genommen worden. Wurzelbewohnende Pilze gewann TERNETZ[6]) von *Vaccinium oxycoccus*; der „Oxycoccuspilz" soll sich in N-freien Nährlösungen wie

2—10 % Dextrose
0,1 % KH_2PO_4
0,02 % $MgSO_4$
4—0,1 % $CaCO_3$
Spuren { NaCl, $FeSO_4$ }

kultivieren lassen (s. o.).

Die in den Wurzeln der Orchideen lebenden Pilze gewann BURGEFF[7]) in der Weise, daß er aus sorgfältig gereinigten Wurzelstücken mit einer sterilisierten Kapillare ein dünnes

1) Nähere Angaben z. B. bei LINDNER, P., 1909, a. a. O.

2) Vgl. z. B. FALCK, Die Kultur d. Oidien u. ihre Rückführung in die höhere Fruchtform bei d. Basidiomyzeten (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1902, **8**, 307); über die Form der Kulturen siehe HUTCHINSON a. a. O.

3) Nach BEYERINCK, M. W., Über die Absorptionserscheinung bei den Mikroben (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **29**, 161).

4) APPEL, O., u. WOLLENWEBER, H. W., Die Kultur als Grundlage zur besseren Unterscheidung systematisch schwieriger Hyphomyz. (Ber. d. D. Bot. Ges. 1910, **28**, 435); Grundlage einer Monogr. d. Gattung F. (Arb. Biol. Anst. 1910, **8**, 1—207).

5) KITASATO, S., Über den Moschuspilz (Zbl. f. Bakt. 1889, **5**, 365); LAGERHEIM, G. v., Zur Kenntnis des Moschuspilzes *Fusarium aquaeductuum* LAGERH. usw. (ibid. 1891, **9**, 655) u. a.

6) Assimil. d. atmosphär. Stickstoffs durch einen torfbewohn. Pilz (Ber. d. D. Bot. Ges. 1904, **22**, 267). — Den Wurzelpilz der Erikazeen — einen zwingenden Beweis dafür, daß der gewonnene Pilz tatsächlich der gesuchte Mykorrhizabildner sei, konnte Verf. allerdings nicht erbringen — kultivierte CH. TERNETZ (Üb. d. Assim. der atmosph. N. durch Pilze, Jahrb. f. wiss. Bot. 1907, **44**, 353) in der Weise, daß 2—4 mm lange Stückchen der Erikazeenwurzeln in 1 % HCl und dann in sterilisiertem H_2O gewaschen und hierauf auf den Nährboden gelegt wurden (Rhododendronblätter oder Torfdekokt und 2 % Agar).

7) BURGEFF, H., Die Wurzelpilze der Orchideen, ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanze. Jena 1909.

Zylinderstück herausstach und mit einem in der Kapillare verschiebbaren Glasfaden das ausgestochene Stückchen aus der Röhre herausbeförderte, nachdem diese samt ihrem Inhalt tief in den Nährboden hineingestoßen worden war. Die besten Resultate erhielt Verf. mit gewöhnlichem Agar und Regenwasser, dem eine Spur Stärke zugesetzt war; zu stark saure Reaktion der Nährböden ist sorgfältig zu vermeiden.

Die „Rußtaupilze", welche Blätter der verschiedensten Pflanzen mit einem schwarzen Belag überziehen (*Fumago, Hormodendron, Cladosporium, Pleospora, Dematium, Coniothecium*), stellen der Kultur auf Pflaumensaft u. a. keine Schwierigkeiten entgegen.[1]) Einige von ihnen sind als Kulturverunreiniger häufig anzutreffen (*Cladosporium, Dematium*).[2])

Actinomyces odorifer (*Cladothrix odorifera*) hat sein Interesse durch die Fähigkeit, den charakteristischen Erdgeruch zu erzeugen. Nach RULLMANN[3]) ist der Mikroorganismus aus Erde zu isolieren; er läßt sich auf den verschiedensten Substraten, Semmel, Erbsenbrei, Bouillon mit Milchzucker (1 %), auf Gelatinenährböden usw. usw. leicht kultivieren. SALZMANN[4]) stellte fest, inwiefern die Produktion des spezifischen Duftstoffes in künstlichen Kulturen durch die Ernährung beeinflußt wird; Verbindungen mit COHO-Gruppen veranlassen Duftstoffbildung. — Mitteilungen über heubewohnende, thermophile A.-Arten bei MIEHE.[5])

Streptothrix-Arten, welche an den Wurzeln vieler höherer Pflanzen vorkommen, isolierte BEYERINCK.[6]) *Str. chromogena*, die nur sehr geringes N-Bedürfnis hat, wächst z. B. in

0,05 % KH_2PO_4
0,05 % $MgSO_4$
1 % Glukose,

jedoch auch in Fleischbouillon oder Malzwürze. Von ihren Stoffwechselprodukten war oben (S. 84) schon die Rede.

Achorion, ein nagel- und haarbewohnender Pilz, wächst auf den üblichen bakteriologischen Nährböden (s. u.).

Über die Aërophilie bzw. Aërophobie der einzelnen Arten[7]) liegen noch keine ausreichenden physiologischen Untersuchungen vor.

Kultur parasitischer Pilze auf lebenden Pflanzen. Die große Schar von Pilzen, welche als Pflanzenparasiten in der Natur vorkommen, sind, wie aus BREFELDS

---

1) Eingehende Untersuchungen bei SCHOSTAKOWITSCH (Üb. d. Beding. der Konidienbildung bei Rußtaupilzen, Dissertation, Basel 1895; auch Flora 1895, Ergänzungsband), der auch die frühere Literatur zitiert.

2) Über letzteres vgl. auch LINDAU in LAFARS Handbuch d. techn. Mykol. 1906, **4**, 274). *Cladosporium* ist nach LAURENT (s. o.) typischer Nitratorganismus.

3) Chemisch-bakteriol. Unters. v. Zwischendeckenfüllungen mit besond. Berücksicht. von *Cl. odorifera* (Dissertation, München 1895); Weitere Mitteil. üb. *Cl. odorifera* (Zbl. f. Bakt. II, 1896, **2**, 116); Weitere Mitteil. üb. *Cl. dichotoma* u. *Cl. odorifera* (ibid. 701).

4) Chem.-physiol. Unters. üb. d. Lebensbeding. v. zwei Arten denitrifiz. Bakt. üb. d. *Streptothrix odorifera* (Dissertation, Königsberg 1902).

5) Über die Selbsterhitzung des Heus. Jena 1906.

6) Über Chinonbildung durch *Streptothrix chromogena* u. Lebensweise dieses Mikrobens (Zbl. f. Bakt. II, 1900, **6**, 2).

7) NEEBE and UNNA, Die bisher bekannten neuen Favusarten (Zbl. f. Bakt. 1893, **13**, 1) u. a.

Beobachtungen hervorgeht, mit ihrer Entwicklung, ja nicht einmal mit ihrer Vermehrung an ihr spezifisches lebendiges Substrat gebunden, das in der Natur als „Wirtspflanzen" sie aufnimmt; allerdings ist es bisher bei vielen Formen noch nicht gelungen, bei Ernährung mit den üblichen Saprophytensubstraten ihren ganzen Entwicklungsgang zu beobachten. Die als Pflanzenparasiten lebenden Pilze verhalten sich in dieser Beziehung ebenso, wie es für viele Saprophyten festgestellt und oben bereits erwähnt worden ist: verschiedene Gestaltungsprozesse der nämlichen Pflanze setzen verschiedene Ernährungs- und Kulturbedingungen voraus; die Bedingungen, unter welchen *Claviceps* Konidien bildet, konnte BREFELD in künstlichen Kulturen dem Pilze bieten; die Bedingungen aber, unter welchen er Sklerotien bildet, ließen sich bisher bei künstlicher Züchtung noch nicht realisieren. Es spricht aber nichts gegen die Annahme, daß es später gelingen wird, auch diese Bedingungen noch zu finden und dem Pilze bei Züchtung auf künstlichem Substrat zu bieten. So wie bei *Claviceps* liegen die Verhältnisse auch bei verschiedenen anderen Pflanzenparasiten. Wollen wir sie kultivieren und besonders mit dem „typischen" Verlauf ihrer Phasenfolge, so bleibt uns vorläufig nichts anderes übrig, als sie auf ihrem spezifischen lebenden Substrat zu züchten. Als eine Methode der künstlichen Kultur kann das Verfahren freilich nicht mehr angesprochen werden. Es darf aber hier nicht völlig übergangen werden, um so weniger, als gerade diese Art der Kultur auf viele wichtige Fragen der Pilzkunde und Pflanzenpathologie Antwort zu geben vermag: einmal lassen uns Kulturversuche mit lebendigen Pflanzen den Entwicklungsgang der heterözischen Pilze erkennen, und anderseits kann oft nur durch künstliche Infektionen von Fall zu Fall entschieden werden, ob ein auf Pflanzen gefundener Pilz pathogen ist oder sich erst sekundär auf den durch andere Faktoren getöteten Pflanzenteilen eingefunden und als Saprophyt breit gemacht hat.

Die Infektion der Versuchspflanzen wird erreicht, indem man Sporen, Keimlinge oder Myzel des fraglichen Pilzes auf jene überträgt. Das Aussaatmaterial wird entweder trocken oder mit Wasser aufgetragen oder auch mit organischen Nährlösungen, wenn man dem Pilz zunächst eine Phase saprophytischer Ernährung möglich machen will. Als allgemeine Regel hat zu gelten, daß man die Versuchspflanzen vor der Infektion auf etwaige Besiedlung durch irgendwelche fremde Pilze zu prüfen und nur solche Exemplare zum Versuch heranzuziehen hat, die keinerlei Anzeichen einer spontanen Infizierung erkennen lassen. Zweitens hat man nach der Infektion dafür zu sorgen, daß die Pflanzen nicht noch spontan anderweitige Infektion außer der beabsichtigten erfahren. Man stellt daher die Pflanzen unter Glocken und samt diesen in geeignete Gewächshäuser — damit ist schon gesagt, daß die Versuchspflanzen in Töpfe zu setzen sind; für fast alle Fälle dürften Topfexemplare ausreichen. Man hat verschiedene Hilfsmittel ersonnen, welche das infizierte Pflanzenmaterial vor weiteren Pilzbesiedelungen bewahren helfen, und ich verweise auf TUBEUFS Schilderung der in Dahlem (bei Berlin) eingerichteten Versuchshäuser (s. u.). Einfache Kulturkästen, in welchen die geimpften Pflanzen untergebracht werden können, hat z. B. MARSHALL WARD[1]) bei Schilderung seiner Uredineenversuche beschrieben. Ist die Benutzung von Freilandpflanzen unerläßlich, so muß man die geimpfte Stelle durch einen geeigneten Glaszylinder schützen oder wenigstens mit einer wasserdichten Pergamentpapiertüte einbinden.

Nachfolgend einige spezielle Angaben. —

---

1) MARSHALL WARD, On pure culture of a Uredinee (*Puccinia dispersa* ERIKSS.) (Zbl. f. Bakt. II, 1903, **9**, 161).

Diejenigen Pilze, welche ihre Wirtspflanzen durch Schwärmsporen infizieren, bedürfen natürlich einer nassen Aussaat. Chytridiazeen (z. B. *Synchytrium taraxaci*) behandelt LÜDI[1]) folgendermaßen. Die frischen, von *Synchytrium* befallenen Blätter werden in frisches Wasser gelegt; nach einigen Stunden treten zahlreiche Schwärmer aus, die das Wasser rötlich färben und eine Art roten Niederschlags bilden. Mit dem zoosporenhaltigen Wasser werden die Versuchspflanzen besprüht, oder sie werden stundenlang in das Wasser eingetaucht.

Wenn man mit Peronosporazeen infizieren will, ist die Versuchspflanze mit Wasser zu übersprühen; dann werden die Konidien, welche bei manchen Gattungen Zoosporen produzieren, bei anderen direkt keimen, übertragen und die geimpften Pflanzen unter Glasglocken gestellt. Über Keimung und Keimlinge vgl. DE BARY.[2])

Mit Exoaszeen sind ebenfalls schon erfolgreiche Impfungen ausgeführt worden. SADEBECK[3]) rief auf Erlen durch Infektion mit *Exoascus epiphyllus* Hexenbesen hervor; die Sporen werden in die Knospen eingeschoben. Über die Pfropfung von Hexenbesenreisern auf gesunde Unterlage vgl. namentlich HEINRICHER.[4])

Die Meltaupilze oder Erysipheen wurden von NEGER[5]) ausführlich studiert. Man übersprüht die Versuchspflanzen oder zerreißt über ihnen die meltautragenden Pflanzenstücke. Die Konidien schweben in dichten Wolken herab und lassen sich auf die benetzten Pflanzenteile nieder. Bei allzu dichter Aussaat der Sporen kommen oft *Botrytis* oder *Acrostalagmus cinnabarinus* auf, welche die Meltaurasen vernichten. Die Keimfähigkeit der Konidien prüft man im hängenden Tropfen.

Über die Infektion mit Uredineen findet man Näheres besonders bei TUBEUF, ED. FISCHER, KLEBAHN u. a.[6]) Die Teleutosporen werden im Herbst gesammelt, in aufgehängten Gazesäckchen oder auf ähnliche Weise im Freien überwintert und später vor der Infektion der Versuchspflanzen zur Bildung der Sporidien angeregt. Letztere erhält man im allgemeinen binnen eines Tages, wenn man die teleutosporentragenden Blätter usw. benetzt und im feuchten Raum unterbringt, oder die Teleutosporen direkt in einem Tropfen Wasser auf die Versuchspflanze legt. Im ersten Fall muß man die Sporidien auf die benetzte Oberfläche der Versuchspflanze übertragen. Für Infektion der Lärchen mit *Me-*

---

1) Beiträge zur Kenntnis der Chytridiazeen. Dissertation, Bern 1901 (Hedwigia, 1901, **40**, 1). Daselbst Hinweise auf die ältere Literatur und beachtenswerte technische Details.

2) Rech. s. le développ. de quelqu. champignons parasites (Ann. Sc. nat. Bot. Ser. IV, 1863, **20**, 5); ferner EBERHARDT, A., Contrib. à l'étude de *Cystopus candidus* (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **12**, 621).

3) Kritische Unters. üb. die durch Taphrinaarten hervorgebrachten Baumkrankheiten (Jahrb. d. wissensch. Anstalten zu Hamburg 1890, **8**).

4) HEINRICHER, E., *Exoascus cerasi* (FUCK.) SADEB. als günstiger Repräsentant hexenbesenbild. Pilze usw. (Naturw. Ztschr. f. Land- u. Forstw. 1905, **3**, 344).

5) Beiträge zur Biol. der Erysipheen, II. Mitteilung (Flora 1902, **90**, 221).

6) v. TUBEUF, Pflanzenkrankheiten durch kryptogame Parasiten verursacht, Berlin 1895; Beschreibung des Infektionshauses und der übrigen Infektionseinrichtungen auf dem Versuchsfelde der Biologischen Abteilung in Dahlem (Arb. der Biol. Anst. d. K. Gesundheitsamtes 1901, **2**, 161); weitere Einrichtungen auf dem Versuchsfelde der Biol. Abt. in Dahlem (ibid. 364); ED. FISCHER, Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über Rostpilze (Beitr. z. Kryptogamenflora d. Schweiz, Bern 1898, **1**) u. a. Arbeiten dess. Autors; KLEBAHN, Die wirtswechselnden Rostpilze, Berlin 1904, 84ff.; daselbst weitere Literaturangaben; MARSHALL WARD, s. o.

lampsora gibt KLEBAHN (a. a. O. 87) eine Vorrichtung an, bei deren Anwendung die Sporidien von selbst auf das zur Infektion bestimmte Organ auffallen. — Äzidiosporen trägt man auf die benetzte Unterseite der Blätter auf, da die Keimschläuche durch die Spaltöffnungen ins Blattgewebe vordringen. Will man sich erst von der Keimfähigkeit der Sporen überzeugen, so bringt man sie zunächst in Wasser zur Keimung. Uredosporen überträgt man durch Abreiben oder Abdrücken des Ausgangsmaterials auf das zur Infektion bestimmte Pflanzenorgan. BREFELD fängt Sporidien, Uredo- und Äzidiosporen in sehr stark verdünnter Bierwürze auf und verstäubt die Flüssigkeit mit dem Pulverisator über den Wirtspflanzen.

Ustilagineen. — BREFELD[1]) gelang es, auf verschiedene Weise mit Sporen sowie mit Ustilagohefen, die in künstlichen Nährlösungen herangezogen worden waren, seine Versuchspflanzen zu infizieren. Es wurden Keimlinge entweder mit Hefe enthaltender Flüssigkeit besprüht, oder es wurden gekeimte oder ungekeimte Körner in die mit Hefen vermischte Erde eingelegt. Später berichtete BREFELD über erfolgreich durchgeführte Blüteninfektion[2]): die Sporen werden auf Narbe und Fruchtknoten von Blüten aufgetragen, die sich zu öffnen im Begriff sind. Nach BREFELD können die Ustilagineen nur junges, noch weiches Wirtsgewebe infizieren, während die Infektion durch Uredo- oder Äzidiosporen der Uredineen meist an entwickelten Pflanzenorganen erfolgt.

Myzelinfektion führt man beim Arbeiten mit den baumzerstörenden Askomyzeten und Basidiomyzeten so aus, daß man Rinden- oder Holzteilchen auf die zur Infektion bestimmten Pflanzen überträgt. Man okuliert sozusagen ein Stückchen der kranken Rinde auf oder schneidet einen schmalen Holzkeil aus der erkrankten Stelle zurecht und führt ihn nach Aufspaltung eines gesunden Astes in diesen ein (TUBEUF).

Kultur von Pilzen auf Tierkörpern. — *Empusa muscae* kultivierte BREFELD[3]) auf lebenden Fliegen, *Entomophthora radicans* auf lebenden Kohlraupen.[4]) Über die Kultur der zu *Cordyceps* gehörigen *Isaria*konidienform vgl. z. B. GIARD[5]); die Konidien wachsen auch auf künstlichen Substraten.

6. Bakterien.

Bei der Allgegenwärtigkeit der Bakterien hat der Anfänger mit dem Beschaffen seines Übungsmaterials keine Schwierigkeiten. Wir fangen Bakterien aus der Luft auf, indem wir geeignete Nährböden kurze Zeit unbedeckt lassen. Wir gewinnen Bakterien aus Sumpf- oder Leitungswasser, aus Schlamm, Gartenerde oder dgl. und stellen mit ihnen unsere ersten Versuche an.

Aschenbestandteile. — Die Frage, was für Aschenbestandteile für die Entwicklung der Bakterien unerläßlich sind, hat großes theoretisches Interesse, aber geringe praktische Bedeutung, da die bescheidenen Mengen

1) Unters. aus d. Gesamtgebiet der Mykol., 11. Heft, 1895, 18ff.

2) Dass., 13. u. 14. Heft.

3) Unters. üb. d. Entwickl. der *Empusa muscae* und *E. radicans* (Abh. naturforsch. Ges., Halle 1871, **12**).

4) Über die Entomophthoreen u. ihre Verwandten (Bot. Zeitg. 1877, **35**, 345).

5) L'*Isaria densa* (LINK) FRIES, champignon parasite du hanneton commun (Bull. scientif. France et Belgique, 1895, **24**).

erforderlicher Aschenbestandteile bei der üblichen groben Arbeitsweise durch Glas, Wasser und unreine Chemikalien reichlich genug in die Nährlösung kommen. BENECKE[1]) stellte fest, daß K, Mg, S und P unerläßlich sind. Ob Fe zu den unentbehrlichen Elementen gehört oder nicht, steht noch dahin. Bei der Herstellung von Nährlösung aus reinen Chemikalien sorge man für einen Gehalt von etwa 0,1 % K_2HPO_4 und 0,02 % $MgSO_4$. Über die spezifische Rolle der einzelnen Elemente ist noch nicht viel bekannt; CACHES Untersuchungen zeigen, daß die Gasproduktion des *Bacterium coli commune* abhängig ist von der Gegenwart des Mg oder Ca[2]); Mg fördert nach den übereinstimmenden Untersuchungen verschiedener Autoren die Pigmentbildung (s. u.); Ca fördert den Stoffwechsel verschiedener Bodenbewohner u. dgl. m.

In der Praxis bedient man sich meist mineralischer Lösungen, welche neben den unerläßlichen auch noch andere Aschenbestandteile, insbesondere NaCl, enthalten. A. MEYER[3]) empfiehlt z. B.

1000	g	Wasser
1	„	KH_2PO_4
0,1	„	$CaCl_2$
0,3	„	$MgSO_4 + 7\,H_2O$
0,1	„	NaCl
0,01	„	Fe_2Cl_6.

Kohlenstoffnahrung. — Den Bakterien kommt hinsichtlich ihrer C-Ernährung eine besondere Vielseitigkeit zu. Kohlensäure wird von den nitrifizierenden Bakterien verarbeitet, sowie von gewissen marinen Schwefelbakterien. Für die nitritbildenden Mikroben kommen kohlensaure Salze als C-Quelle in Betracht. KASERER[4]) und SÖHNGEN[5]) machten mit Bodenbakterien bekannt, welche Methan als Kohlenstoffquelle verwerten. Bakterien, welche amorphe Kohle als einzige Kohlenstoffquelle verwerten, fand POTTER.[6])

Die Vertreter der übrigen Bakteriengruppen beanspruchen als C-Quelle dieselben organischen Verbindungen, die oben bei Behandlung der C-Ernährung der Pilze zu nennen waren; vor allem sind die Kohlehydrate und neben ihnen die mehrwertigen Alkohole auch für die Bakterien außerordentlich wertvoll; immerhin gibt es nicht wenig Formen, welche als streng

1) Unters. über d. Bedarf d. Bakt. an Mineralstoffen (Botan. Zeitg. I, 1907, **65**, 1).
2) CACHE, Rolle der $MgNH_4PO_4$ bei der Zubereitung von Nährböden (Zbl. f. Bakt. I, 1906, **40**, 255).
3) Praktikum der botan. Bakterienkunde. Jena 1903, 15.
4) Üb. d. Oxyd. des Wasserstoffs u. d. Methans durch Mikroorg. (Zeitschr. f. landwirtsch. Versuchswesen Österr. 1905, **8**, 789).
5) Üb. Bakt., welche Methan als Kohlenstoffnahrung u. Energiequelle gebrauchen (Zbl. f. Bakt. II, 1905, **15**, 513).
6) POTTER, C., Bact. as agents in the oxyd. of amorphous carbon (Proc. Roy. Soc. B. 1908, **80**, 239; vgl. auch Zbl. f. Bakt. II, 1908, **21**, 647).

„saccharophobe" besser mit Säuren ernährt werden.[1]) Die Ansprüche der Bakterien an die Quantität der ihnen gebotenen Kohlehydrate sind außerordentlich verschieden: saccharophil nennt CZAPEK[2]) diejenigen Bakterien, die noch in Nährlösungen mit mehr als 15 % Glukose gut wachsen, saccharophob diejenigen, die nach vorangegangener Kultur in stark verdünnter Lösung ($^4/_{1000}$ Glukose) schon bei einem 12 % übersteigenden Glukosegehalt in ihrem Wachstum gehemmt werden. *Micrococcus aquatilis* wächst noch in 2:10 000 000 000 % Glukose (CZAPEK).

Besonders wichtig werden die Zuckerarten für die Anaëroben (s. u.) als reduzierbare, O-liefernde Substanzen, sowie als Verbindungen, deren Spaltung ihnen Energie liefert. Gute Nährstoffe für Bakterien überhaupt fand MAASSEN[3]) in folgenden Säuren: Apfelsäure, Zitronensäure, Fumarsäure, Glyzerinsäure, Bernsteinsäure, Milchsäure, Schleimsäure, Weinsäure, Essigsäure usw. — in absteigender Reihenfolge ihres Nährwertes aufgezählt. Manche Bakterien greifen Säuren erst an, wenn ihnen gleichzeitig andere C-Verbindungen (z. B. Glyzerin) geboten werden.

Stickstoffnahrung. — Auch hier bewährt sich die ernährungsphysiologische Vielseitigkeit der Bakterien. Die der Leguminosenknöllchen und verschiedene andere Bodenbewohner fixieren den elementaren Stickstoff der Atmosphäre. Andere Mikroben verarbeiten Nitrite, Nitrate, anorganische oder organische Ammoniumsalze, Amidoverbindungen oder Pepton. Wie bei Besprechung der Pilze sind auch hier die Amidoverbindungen und Pepton als besonders wertvolle Nährstoffe zu nennen.

Einzelheiten müssen auf die Besprechung der verschiedenen Bakteriengruppen verspart bleiben.

Reaktion. — Die alte Regel, daß Bakterien auf alkalisch reagierendem Nährboden zu züchten sind, besteht im allgemeinen durchaus zu recht, darf aber nicht dahin verstanden werden, daß saure Nährböden ein für allemal Bakterienvegetation ausschlössen. Die Essigsäurebakterien sind neben anderen säurezehrenden Bakterien bekannte Beispiele für besonders säureliebende Organismen.

Nährböden, welche nicht von vornherein alkalisch reagieren, alkalisiert man mit Sodalösung oder NaOH.

Der Grad der Alkaleszenz, welcher den verschiedenen Bakterienarten optimales Wachstum gestattet, ist sehr verschieden; besonders dann, wenn man z. B. bei wasseranalytischen Untersuchungen auf einer Kulturplatte Mikroben der verschiedensten Art züchten will, ist die Frage nach der Alkalisation des Nährbodens nicht leicht zu beantworten; um vergleichbare Resul-

1) Vgl. z. B. KOHN, E., Zur Biol. d. Wasserbakt. (ibid. II, 1905, **15**, 722).

2) CZAPEK, F., Zur Kenntnis d. Stoffwechselanpass. bei Bakt. usw. (Chiari-Festschr. 1908, 157).

3) Beitr. z. Ernährungsphysiol. d. Spaltpilze. Die organ. Säuren als Nährstoffe u. ihre Zersetzbarkeit durch d. Bakt. (Arb. k. Gesundheitsamt 1896, **12**, 340).

tate zu erhalten, muß man vor allem den Nährböden stets den gleichen Grad der Alkaleszenz geben.[1]) PRALL stellt den Neutralitätspunkt mit Lakmus fest und gibt noch 0,15 % kristallisiertes Soda zu. Andere Bakteriologen neutralisieren unter Benutzung von Phenolphtaleïn.

Die Anaëroben scheinen einen starken Grad von Alkaleszenz zu vertragen.[2])

Die Reaktion der Nährböden bleibt während der Entwicklung der Bakterien durchaus nicht die gleiche. Vor allem spielt bei sehr vielen Formen die Produktion von Säure (Essigsäure, Milchsäure, Oxalsäure u. a.) eine wichtige Rolle. Die Milchsäure hat deswegen besondere Bedeutung, weil sie bei Ernährung mit Zucker oder mehrwertigen Alkoholen von sehr vielen Bakterien und auch von solchen gebildet wird, welche gegen Säuren sehr empfindlich sind (s. u.). Vgl. auch das später unter „Stoffwechselprodukten" Gesagte. — Entwicklungsfähig auch auf sauren Nährböden sind (außer den Säuregärungserregern) z. B. *Bac. prodigiosus*, der Tuberkelbazillus u. a.[3])

Konzentration. — Über die optimalen Konzentrationen der Nährsubstrate geben die oben zusammengestellten Rezepte Auskunft. Gleich den Pilzen können sich auch Bakterien an hohe Konzentrationen anpassen. A. FISCHER[4]) fand für den Heubazillus die Grenzkonzentration für das Wachstum bei 8 % NH_4Cl, 12 % NaCl, 14 % KCl, 21 % KNO_3; LEWANDOWSKY[5]) kultivierte *Bacillus mesentericus* bei 30 % NaCl. Über den Einfluß der Konzentration auf die Bewegung der Bakterien macht FISCHER (a. a. O.) Mitteilungen; den Einfluß der Konzentration auf die Ernährung der Mikroben behandelt RUBNER[6]); über die Permeabilität des Bakterienplasmas für osmotisch wirksame Stoffe stellte FISCHER (a. a. O.) Untersuchungen an: Plasmolyse in 15 % Rohrzucker geht nach 10 Minuten zurück.

Empfehlenswerte Nährböden. — Bakterien werden in Nährlösungen und auf festen Substraten kultiviert, insbesondere auf Gelatine, Agar und Gelatine-Agarmischung. Solange kein Grund vorliegt, bei einem Bak-

1) Vgl. PRALL, Beitr. z. Kenntnis der Nährböden für die Bestimmung der Keimzahl im Wasser (Arb. k. Gesundheitsamt 1902, **18**, 436); DEELEMAN, M., Der Einfl. der Reaktion der Nährböden auf das Bakterienwachstum (ibid. 1897, **13**, 374); HESSE, W., Über d. Einfl. d. Alkaleszenz des Nährbodens auf d. Wachstum d. Bakt. (Zeitschr. f. Hyg. 1893, **15**, 183).

2) Nach MATZUSCHITA (Zur Physiol. d. Sporenbildung d. Bazillen usw., Dissertation, Halle a. S. 1902) hört ihr Wachstum erst bei 10—15 % Soda auf.

3) Vgl. z. B. SCHLÜTER, Wachst. d. Bakt. auf saurem Nährboden (Zbl. f. Bakt. 1892, **11**, 589); PROSKAUER u. BECK, Beitr. z. Ernährungsphysiol. d. Tuberkelbazillen (Zeitschr. f. Hyg. 1894, **18**, p. 128) u. a.

4) Unters. üb. Bakterien (Jahrb. f. wiss. Bot. 1895, **27**, 1), daselbst einige weitere Literaturangaben.

5) Üb. d. Wachstum v. Bakt. in Salzlösungen v. hohen Konzentrationen (Arch. f. Hyg. 1904, **49**, 47).

6) Bezieh. zw. Bakterienwachstum u. Konzentration d. Nahrung (Stickstoff- und Schwefelumsatz) (Arch. f. Hyg. 1906, **57**, 161).

terium besondere Ernährungsansprüche zu vermuten, wird man seine Züchtung mit Hilfe eines der „üblichen“ beginnen. Einige der erprobten, seit vielen Jahren gebräuchlichen Nährböden nenne ich im folgenden.

Eine einfache Nährlösung von bekannter Zusammensetzung gab 1858 Pasteur[1]) an:

100 g destilliertes Wasser,
10 „ reinster Kandiszucker,
1 „ weinsaures Ammonium,
Asche von 1 Teil Hefe;

später empfahl F. Cohn[2]) eine „normale Bakterien-Nährflüssigkeit“, die von organischen Verbindungen nur weinsaures Ammonium als N- und C-Quelle enthielt:

20 ccm Wasser
0,1 g phosphorsaures Kalium
0,1 „ schwefelsaure Magnesia
0,01 „ dreibasisch phosphorsaurer Kalk
0,2 „ weinsaures Ammoniak.

Die Uschinskysche Flüssigkeit[3]) enthält:

Wasser	1000	g
Glyzerin	30—40	„
Chlornatrium	5—7	„
Chlorkalzium	0,1	„
Magnesiumsulfat . . .	0,2—0,4	„
Dikaliumphosphat . . .	2—2,5	„
Ammonium lacticum .	6—7	„
Natrium asparaginicum.	3,4	„

C. Fränkel[4]) gibt folgende Modifikation an:

Wasser	1000	g
Kochsalz	5	„
Kaliumbiphosphat . .	2	„
Ammonium lacticum .	6	„
Asparagin	4	„

verdünnte Natronlauge bis zu deutlich alkalischer Reaktion.

Weitere Modifikationen finden sich bei A. Meyer[5]), der auch folgende Nährlösungen anführt:

1) Vgl. C. R. Acad. Sc. Paris 1861, **52**, 346; auch Mayer, A., Unters. üb. d. alkohol. Gärung 1870 u. a.
2) Cohn, Unters. üb. Bakt. (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1872, **1**, 127, 195).
3) Über eine eiweißfreie Nährl. f. pathogene Bakt. usw. (Zbl. f. Bakt. 1893, **14**, 316).
4) Beitr. z. Kenntn. d. Bakterienwachstums auf eiweißfreien Nährlösungen (Hygien. Rundschau 1894, 770, 772).
5) Praktikum der botan. Bakterienkunde. Jena 1906, 24.

Zu einer mineralischen Nährlösung (s. o. S. 161) werden pro 100 ccm Lösung

1 g Asparagin
oder {1 „ Asparagin und / 3 „ Dextrose}
oder {1 „ Asparagin / 1 „ Glyzerin und / 0,5 g Rohrzucker}

zugesetzt.

Sogenanntes Peptonwasser enthält in 1 l Wasser 10 g Pepton und 10 g Kochsalz.

Unentbehrliche Hilfsmittel des Bakteriologen sind seit langer Zeit organische Produkte meist animalischer Provenienz, die in Form von Lösungen Verwendung finden oder mit Gelatine oder Agar zu „festen" Nährböden verarbeitet werden. Hinsichtlich der Konzentration, in welcher die Gallerten herzustellen sind, gilt das im Allgemeinen Teil Gesagte; aus Wolfs Untersuchungen wissen wir, daß Bakterien erst auf Nährböden, die etwa 60 % Trockensubstanz enthalten, ihr Wachstum einstellen.[1])

Zu den beliebtesten Nährmedien gehört Kochs Nährgelatine:

in Fleischwasser (s. o. 25)
10 % Gelatine
1 % Pepton (z. B. Witte)
0,5 % Kochsalz.

Statt 10 % Gelatine kann man hier wie bei den später angegebenen Gelatinerezepten auch ca. 1,5 % Agar nehmen („Nähragar"). Ähnliches leistet Liebig-Peptongelatine:

10 % Gelatine
1 % Pepton
1 % Liebigs Fleischextrakt
0,5 % Kochsalz.

Neben Liebigs Extrakt leisten auch Maggis Präparate gute Dienste. Der „Ragitagar" (nach Marx)[2]) enthält Agarpulver, Pepton und „gekörnte Bouillon" von Maggi, „Ragitbouillon" nur die beiden letzten Bestandteile.

Heyden-Nährstoff, Nutrose, Tropon, Somatose und ähnliche Eiweißpräparate verwendet man in 0,5—1 % Lösung.

---

1) Wolf, L., Üb. d. Einfl. d. Wassergehaltes d. Nährb. auf d. Wachst. d. Bakt. (Dissert. Würzburg 1899). Weigert, R., Üb. d. Bakterienwachstum auf wasserarmen Nährböden (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1904, **36**, 112). — Bakterien, die sich nicht auf, sondern in Gelatine entwickeln, verhalten sich ganz ähnlich; vgl. Jorns, A., Üb. d. Wachst. d. Bakt. in und auf Nährböden höherer Konzentr. (Arch. f. Hyg. 1907, **63**, 123).

2) Marx, Z. Vereinf. d. Nährbodendarst. mittels Ragitpulver (M. med. Wochenschr., 1910, No. 7); die Präparate liefert Merck-Darmstadt.

Traubenzucker-Nährgelatine oder Milchzucker-Nährgelatine enthalten außer Pepton und Fleischwasserstoffen noch 0,3—0,5 % Trauben- oder Milchzucker. Bei reichlicherem Zusatz von Zucker werden von den Bakterien oft allzu große Mengen Säure gebildet, welche die Entwicklung der Kultur hemmen können.

Glyzerinagar enthält außer den Substanzen des Fleischwasseragars 4—6 % Glyzerin.

Milch und Blut werden nach Sterilisation bezw. steriler Entnahme vom Tierkörper als Nährlösungen verwendet. Molken stellt man sich her, indem man zu 1 l Milch ca. ½ Eßlöffel Labessenz zusetzt und nach Ausfallen des Käses die Masse aufkocht; hiernach wird die klare Masse durch ein Tuch abgeseiht. Blut wird ferner zu Blutagar verarbeitet, indem man es mit Agar vermischt oder auf erstarrtem Agar aufträgt. Auf wichtige Gesichtspunkte, welchen bei Verwendung des Blutes als Nährboden Rechnung zu tragen ist, hat Bass aufmerksam gemacht (s. o. S. 101, Züchtung der Malariaplasmodien). Vom Serum war schon oben die Rede (vgl. S. 87).

Namentlich für pathogene Bakterien hat man sich weiterhin menschlicher oder tierischer Organe und Organbreie u.s.f. (Leber-, Gehirn-, Placentabreie usw., Ascitesflüssigkeit) als Kulturmedien bedient. Cantani[1]) konserviert allerhand eiweißreiche Medien (Eiter, Urin, Sperma usw.) in Glyzerin (zu gleichen Teilen mit jenen gemischt); auch wenn die ersteren keimhaltig sind, werden sie im Glyzerin allmählich steril. Hiernach werden die „Glyzerolate" den Nährmedien zugesetzt (0,5—0,75 ccm auf ein Reagensglas). Wie sich von selbst versteht, sind solche Beimengungen nur bei Kultur von Bakterien zulässig, welche Glyzerin vertragen. Von weiteren Nährböden, die nur bei Kultur bestimmter Mikrobengruppen Anwendung finden, wird später zu sprechen sein.

Isolierung, Anreicherung, elektive Kultur. — Am vielseitigsten in ihrer Anwendbarkeit ist die alte Kochsche Methode des Plattengießens, die freilich nicht für ein Universalmittel gelten darf, da es nicht an Mikroben fehlt, die auf Gelatine nicht wachsen oder der unerläßlichen hohen Temperatur eines verflüssigten Gallertsubstrats nicht widerstehen.

Wenn auf einer Platte außer den zur Untersuchung vorliegenden Mikroben noch andere Organismen sich entwickeln — Pilze oder Bakterien, — so kann man die fremden Eindringlinge durch Betupfen mit Silbernitrat (Höllenstein) beseitigen, vorausgesetzt, daß der Nährboden Chlornatrium enthält, welches an der behandelten Stelle unlösliches Chlorsilber entstehen läßt. Andernfalls verbreitet sich das Silbernitrat durch Diffusion in der Gela-

1) Cantani, A., Üb. eine praktisch sehr gut verwendb. Methode, albuminhaltige Nährböden f. Bakt. zu bereiten (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1910, 53, 471). Poppe, K., Üb. Glyzerolatnährb. (ibid. 1911, 58, 474).

tineplatte und wird auch den Kolonien, welche erhalten bleiben sollen, gefährlich.[1])

Geht man von einem Bakteriengemisch aus, in welchem die gesuchte Spezies nachweislich oder vermutlich nur spärlich enthalten ist, so schickt man der Isolierung zweckmäßigerweise eine „Anreicherung“ voraus, d. h. man bringt das Bakteriengemisch unter Bedingungen, die gerade der gewünschten Spezies günstig sind. Beim Nachweis des Choleravibrios z. B. tun die Anreicherungsmethoden gute Dienste: Proben von dem vibrionenhaltigen Material bringt man in Peptonwasser; im Thermostaten (37°) bilden die Cholerabakterien an der Oberfläche der Flüssigkeit bald ein Häutchen, aus dem sie dann mit größerer Sicherheit als Reinkulturen gewonnen werden können als aus dem ursprünglichen Material. Handelt es sich um Bakterien, die ernährungsphysiologisch besondere Eigentümlichkeiten aufweisen, und welche optimal unter Bedingungen gedeihen, welche andern Mikroben überhaupt keine Entwicklung gestatten, so kann Anreicherung an sich schon zu Reinkulturen führen. Diese Methode der sog. elektiven Kultur kann dann, wenn es sich um weitverbreitete Formen handelt, gleichzeitig zum Einfangen und Fortzüchten der gewünschten Organismen dienen. Impft man mehrmals über, so bleiben etwaige Verunreinigungen mit fremden Organismen mehr und mehr zurück.

Die Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen hohe Temperaturen ist seit Roberts[2]) oft zum Isolieren bestimmter Bakterienarten benutzt worden; vgl. das über Heubazillen und Buttersäurebakterien Gesagte.

Impfung. — Das Impfen macht bei den Bakterien im wesentlichen dieselben Manipulationen nötig, wie bei allen anderen Mikroorganismen. Man streicht die bakterienführende Impfplatinnadel auf dem Nährboden zur Strichkultur ab oder sticht mit der Nadel in den Nährboden hinein (Stichkultur). Letztere Methode ist besonders nützlich, wenn man das Verhalten der Mikroben in tieferen Schichten und an der Oberfläche des Substrats vergleichen will. Man darf nicht mit zu geringen Aussaatmengen eine Stichkultur anlegen, damit auch in die Tiefe noch Individuen in ausreichender Menge eingeführt werden. Will man im Innern eines Nährbodens (im Reagensglas) die Mikroben annähernd gleichmäßig verteilen, so schüttelt man die noch flüssige Gelatine (oder Agar) gut durch und läßt dann erstarren.

Form der Kolonien. — An den Kolonien, welche die Bakterien auf geeigneten Nährböden bilden, lassen sich allerhand unterschiedliche Eigentümlichkeiten wahrnehmen, die in hohem Maße von den jeweils gebotenen Bedingungen, der Art des Nährbodens usw. abhängen, zum Teil aber auch als charakteristisch für die betreffenden Spezies betrachtet werden dürfen.

1) Hiltner u. Störmer, Stud. üb. d. Bakterienflora d. Ackerbodens usw. (Arb. biolog. Abt. d. k. Gesundheitsamtes 1903, 3, 445).

2) Philos. Transact. R. Soc. 1874.

— Kolonien, welche innerhalb der Agarmasse sich entwickeln, fallen durch ihre linsenförmige Gestalt auf: der spröde Agar spaltet sich an der Stelle, an welcher Bakterien sich entwickeln, und diese füllen den Spalt.[1])

Welche Faktoren die Richtung des Spaltes bedingen — die Richtung des stärksten Wachstums der Organismen, die Spaltbarkeit des Geles, der mechanische Widerstand, den die festen Wände des Kulturgefäßes dem Agar etc. entgegensetzen — bedarf noch näherer Untersuchung. Auf alle Fälle ist die Form der im Gel wachsenden Kolonien bedingt durch die physikalischen Bedingungen, die in jenem verwirklicht sind; das geht schon aus der Ähnlichkeit der linsen- oder wetzsteinförmigen Luftblasen, die in gallertigen Medien sich bilden, mit den Tiefenkolonien hervor. Langsam wachsende Kolonien verharren nach Orsós in der primären Kugelform; schnellerwachsende gehen allmählich zur Ellipsoid- oder „Saturnusform" über (vgl. Fig. 24): die Äquatorebene der letzten entspricht der Spaltungsebene im Gel. Treten zwei Spaltungen auf, so entsteht nach Orsós eine „Triphyllos"- oder Dreiblattform (Fig. 25), kompliziertere Formen kommen bei noch zahlreicheren Spaltungen zustande. Oberflächlich wachsende Kolonien breiten sich als Häutchen, Scheiben, oblatenartige Gebilde, als Knöpfchen, kleine Polster usw. aus, oder sie gleichen reichverzweigten Dendriten, bilden lange Ausläufer, lockenähnliche Formen usw. Die Oberfläche einer scheibenförmigen Bakterienkolonie ist entweder ganz gleichmäßig und mehr oder minder glänzend oder matt, gestreift oder gekörnt, der Rand glatt, fein stachelig oder haarig u. dgl. m. Von „Nagelkulturen" spricht man, wenn den ganzen Impfstich entlang sich Organismen entwickeln und an der Oberfläche in besonders kräftiger Vegetation ein nagelkopfähnliches Polster zustande kommt.



Fig. 24. Saturnusförmige Kolonien (*Bact. typhi*) (nach Orsós).

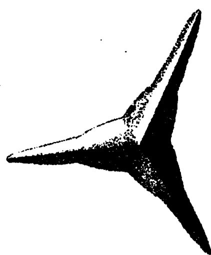


Fig. 25. Triphyllos-Kulturen (nach Orsós).

Von allergrößter Bedeutung bei Bestimmung einer Bakterienspezies und Beurteilung ihrer physiologischen Eigentümlichkeiten ist die Frage, ob

1) Vgl. Hutchinson, Über Form und Bau der Kolonien niederer Pilze (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **17**, 65); vgl. ferner Dunham, E. K., Üb. d. Einfl. physik. Beding. auf. d. Charakter von Kolonien auf Gelatineplatten (ibid. II, 1903, **10**, 382); Almagia, Einfl. d. Nährb. auf d. Morph. d. Kol. usw. (Arch. f. Hyg. 1906, **59**, 159) und besonders Orsós, Fr., Die Form der tiefliegend. Bakt.- u. Hefekol. (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1910, **54**, 289).

Gelatine verflüssigt wird oder nicht. Bleibt die Verbreitung der Bakterien und die Verflüssigung der Gelatine auf enge Zonen beschränkt, so entstehen Löcher und Gruben in der Gallerte. Bei kräftiger Verflüssigung werden die verflüssigenden Bakterien über die ganze Oberfläche der Gelatine verschleppt. Ebenso kann bei Agarkulturen das Kondenswasser die Bakterien überall hin verteilen. Die Kolonien gewisser verflüssigender Fäulnisbakterien, welche in dünner Gelatine sich vorwärts bewegen können, bilden auf der Oberfläche der Gelatine verflüssigende Ausläufer („schwärmende Inseln") und dringen ins Innere des Nährbodens mit schraubig gewundenen Bakterienmassen vor („Spirulinen"). GÜNTHER[1]) macht darauf aufmerksam, daß von den Kolonien beweglicher Mikroben dann, wenn die Gelatine vorübergehend (z. B. durch Besonnung) weich oder flüssig wird, einzelne Individuen sich entfernen können; wird die Gelatine wieder fest, so bleiben jene Individuen an ihren Ort gebannt und entwickeln eine kleine Kolonie. Die „primäre" Kolonie ist nach GÜNTHER zuweilen von einem ganzen Heer kleiner „sekundärer" Kolonien umgeben.

Sehr merkwürdig wirken die Spannungen der Gelatinenährböden. Auf diesen beruht die von JACOBSEN[2]) u. a. studierte „Elastikotropie" des *Bacterium Zopfii*, das sich bei seiner Verbreitung im festen Nährboden von den Druck- und Zugspannungsverhältnissen in letzterem leiten läßt. Solche Spannungen kommen in Gelatine beim Erstarren, beim Eintrocknen und bei künstlichen Deformationen der erstarrten Masse zustande. Fig. 26 veranschaulicht ein von JACOBSEN angestelltes Experiment und die Wirkung des Eingriffs auf die Wachstumsfiguren des *Bact. Zopfii*.

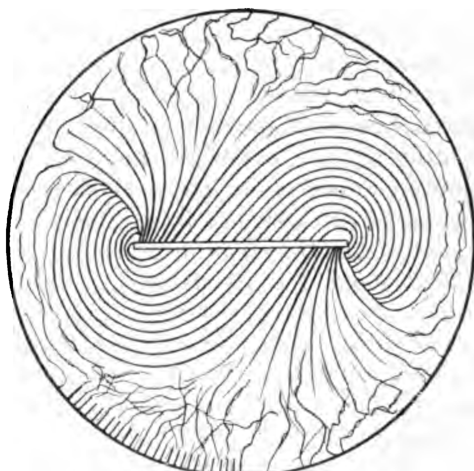


Fig. 26. Kultur von *B. Zopfii* in verdünnter Gelatine, welche durch Drehen eines am Deckel befestigten Objektträgers in Spannung gebracht ist. Am Rand der Schale ist links unten die radiale Stellung angegeben, welche der Bazillus beim Eintrocknen der Gelatine einnimmt.

Kultur in Kollodiumsäckchen. — Bei manchen pathogenen Organismen, die der Kultur auf gewöhnlichen Nährböden besonders schwer zugänglich sind, hat man sich mit dem Kollodiumsäckchenverfahren geholfen, das der Schule des Institut PASTEUR entstammt. Es werden kleine Kollodiumsäckchen (s. o. S. 90) mit Nährflüssigkeit gefüllt, im Autoklaven sterili-

1) Einführ. in d. Stud. d. Bakt., 6. Aufl. 1906, 226.

2) Über einen richtenden Einfl. beim Wachstum gewisser Bakterien in Gelatine (Zbl. f. Bakt. 1906, **17**, 53); SERGENT, E., Des tropismes du *Bact. Z.* KURTH (Ann. Inst. Pasteur 1907, **21**, 842).

siert, geimpft und verschlossen; dann werden sie in die Leibeshöhle des Versuchstieres eingelegt. Bei verschiedenen Bakterien hat man mit Hilfe dieser Methode überraschende Kulturresultate erzielen können.[1])

Ultramikroorganismen. — Die untere Grenze der mikroskopisch wahrnehmbaren Teilchen liegt nach Abbe bei 0,21 μ. Es gibt Organismen, welche hart an dieser Grenze liegen, und es liegt daher die Vermutung nahe, daß noch kleinere Lebewesen existieren könnten[2]), deren Gegenwart höchstens bei Untersuchung mit dem Ultramikroskop nachgewiesen werden kann. Die Möglichkeit ist zuzugeben; doch sind bisher „Ultramikroorganismen", die nur unter dem Ultramikroskop sichtbar und bei der gewöhnlichen mikroskopischen Untersuchung nicht wahrnehmbar wären, nicht bekannt geworden.[3])

Beziehungen zum Sauerstoff, Atmung und Gärung. — Die Vorgänge der Atmung und Gärung erreichen bei keiner Pflanzengruppe eine solche Mannigfaltigkeit, wie bei den Bakterien; da ihre Ansprüche an freien Sauerstoff, sauerstoffhaltige oder vergärbare Stoffe beim Anlegen der Kultur und bei der Wahl eines geeigneten Nährbodens von größter Bedeutung sind, müssen wir hier auf die Atmungs- und Gärungsphysiologie der Bakterien wenigstens kurz eingehen.

Viele Bakterien beanspruchen freien Sauerstoff, wir bezeichnen sie als obligat aërob; die Herstellung der Kulturen macht — was die über ihnen liegende Atmosphäre betrifft — keine besonderen Umstände. Der Sauerstoff wird zur Oxydation von Kohlehydraten verwendet, zur Oxydation von schwefliger Säure zu Schwefel und Schwefelsäure (Schwefelbakterien s. u.), zur Oxydation von Eisenoxydul zu Eisenoxyd (Eisenbakterien s.u.), zur Verbrennung von Wasserstoffgas zu Wasser. Als Beispiele obligat aërober Bakterien mögen die Essigbakterien, der Heubazillus, *Sarcina lutea* u. a. gelten.

Anaërobe Bakterien sind diejenigen, welche ohne freien Sauerstoff sich entwickeln. Wie man den Sauerstoff der Luft von Kulturen fernhalten kann, wurde oben auseinandergesetzt (S. 65ff.). Jede anaërobe Entwicklung setzt die Gegenwart gewisser Verbindungen im Nährsubstrat voraus, die entweder von den Mikroben reduziert werden oder ohne Sauerstoffentzug von diesen gespaltet werden können. Die ersteren geben ihren Sauerstoff an die Organismen ab, die anderen werden bei ihrer Spaltung zur Quelle der erforderlichen Energie für die Mikroben. Als reduzierbare Substanzen

1) Metchnikoff, Roux et Salimbeni, Toxine et antitoxine cholérique (Ann. Inst. Pasteur 1896, **10**, 257); Nocard et Roux, Le microbe de la péripneumonie (ibid. 1898, **12**, 240); Levaditi, Cult. du spirille de la fièvre récurr. afric. de l'homme (C. R. Acad. Sc. Paris 1906, 142); Levaditi u. Mc Intosh, Contrib. à l'étude de la culture de *Treponema pallidum* (Ann. Inst. Pasteur 1907, **21**, 784).

2) Betrachtungen über die Dimensionen kleinster Lebewesen bei Errera, S. la limite de petitesse des organismes (Rec. Inst. bot. Univ. Bruxelles 1903, **6**, 73).

3) Molisch, H., Üb. Ultramikroorganismen (Bot. Zeitg. 1908, **66**, I, 131).

kommen anorganische und organische Verbindungen in Betracht. Als anorganische sind die Sulfate zu nennen; von organischen O-Quellen sind die Zuckerarten weitaus die wichtigsten und nächst ihnen die Salze organischer Säuren (weinsaure, milchsaure, ameisensaure Salze). Es entstehen bei der Reduktion organischer Verbindungen Säuren, welche die Reaktion des Nährbodens wesentlich verändern können (s. o.).

Zweitens gewinnen anaërobe Mikroben ihre Energie durch Spaltung bestimmter Verbindungen. Spaltung anorganischer Stoffe liegt bei der Tätigkeit salpeterspaltender Organismen (s. u.) vor. Die Hauptrolle unter den spaltbaren organischen Stoffen spielen wiederum die Zuckerarten: bei Alkohol- und Milchsäuregärung entstehen aus diesen Endprodukte, die in ihrer Summe ebensoviel Sauerstoff enthalten wie das Ausgangsmaterial.

Die Mikroben, welche anaërob sich entwickeln können, zeigen untereinander verglichen alle möglichen Abstufungen in ihrem Verhalten zum Sauerstoff; das Ende der Reihe bilden die sog. obligaten Anaëroben, deren Entwicklung durch Zutritt von freiem O sofort unterbrochen wird (vgl. jedoch auch das oben S. 72 Gesagte,) während bei den fakultativen Anaëroben Entwicklung bei O-Zutritt und O-Abschluß möglich ist. —

Für die Beurteilung mancher an Bakterienkulturen auftretenden Erscheinungen ist die Kenntnis der BEYERINCKschen Atmungsfiguren[1]) wichtig: die Bakterien suchen stets diejenigen Orte auf, an welchen die ihnen günstigste Sauerstoffspannung anzutreffen ist; da aber die Ansprüche verschiedener Bakterienformen ungleich sind, tritt eine Sonderung ein, so daß es sogar gelingt, bestimmte Arten rein oder nahezu rein wegzufangen. Das letztere gelang BEYERINCK[2]) mit Spirillen. — Eine besondere Art der Atmungsfiguren sind nach demselben Autor die Emulsions- und Sedimentfiguren[3]); in dünnen Schichten der Nährlösungen bilden die meisten beweglichen Bakterien merkwürdige Ansammlungen: entweder es entstehen säulen- oder leistenartige Gruppen, welche die Flüssigkeitsschicht in ihrer ganzen Dicke in Anspruch nehmen, oder plattenförmige, die auf dem Boden liegen. Aus den ersteren, den Emulsionsfiguren, gehen übrigens durch Absetzen die anderen hervor. BEYERINCK zeigte, daß auch hier die Verteilung des Sauerstoffs die Gruppierung bedingt.[4]) —

---

1) Über Atmungsfiguren beweglicher Bakterien (Zbl. f. Bakt. I, 1893, **14**, 827).

2) Notiz über den Nachweis von Protozoen und Spirillen in Trinkwasser (ibid. 1894, **15**, 1).

3) BEYERINCK, Emulsions- und Sedimentfiguren bei beweglichen Bakterien (ibid. II, 1897, **3**, 1).

4) Die Erscheinungen bedürfen im einzelnen noch näherer Aufklärung. Man vergleiche z.B. noch die Arbeiten von JEGUNOW, Bakteriengesellschaften (Zbl. f. Bakt. II, 1896, **2**, 11, 441, 739); JEGUNOW, Lois du mouvement de la foule microbienne (ibid. II, 1907, **18**, 1; daselbst weitere Literatur) und LEHMANN, K. B., und CURCHOD, H., Beiträge zur Kenntnis des Bakterienniveaus von BEYERINCK und der Bakteriengesellschaften von JEGUNOW (ibid. 1904, **14**, 449).

Daß Sauerstoffzufuhr einen besonderen formativen Effekt haben kann, wies Matzuschita (a. a. O.) für einige Anaëroben nach: sowohl fakultative wie obligate Anaërobe bilden nach Kultur im O-freien Raum bei nachträglichem Luftzutritt Sporen.

Genauen Bericht über die Atmungsphysiologie der Bakterien hat neuerdings Benecke erstattet, auf dessen Werk hier verwiesen sei.[1])

Temperatur. — Die aus Luft oder Wasser aufgefangenen Mikroben können bei Zimmertemperatur kultiviert werden; die pathogenen Formen, die in Warmblütern parasitisch leben, haben ihr Wachstumsoptimum bei 37°. Eine Reihe von Mikroben macht noch höhere Temperaturansprüche und gedeiht erst bei 40, 50 und 60° optimal; viele haben ein niedrigeres Optimum, wachsen aber auch bei diesen hohen Temperaturgraden noch gut. Für die Kultur derjenigen Organismen, deren Optimum höher liegt als Zimmertemperatur beträgt, bedarf es eines Brutschrankes oder Thermostaten (S. 74).

„Thermophile" Bakterien erhält man nicht nur aus heißen Quellen, sondern besonders leicht auch aus Mist, Heu u. a.[2]) Koch und Hoffmann haben übrigens für eine Reihe thermophiler Lebewesen gezeigt, daß ihre Abhängigkeit von hohen Temperaturen nur eine bedingte ist, insofern als sie bei Kultur auf den üblichen Nährmedien zwar solche verlangen, in der freien Natur aber auch bei erheblich bescheideneren Wärmegraden gedeihen.[3])

Die Bakterien passen sich leicht an Temperaturen an, die ihrem ursprünglichen Optimum — nach unten oder oben — recht fern liegen[4]), allerdings verlieren die Mikroben bei Kultur unter abnormalen Temperaturverhältnissen oder nach vorübergehender Einwirkung hoher Temperaturgrade (z. B. 50—55°) zuweilen die eine oder die andere ihrer Eigenschaften wie die Fähigkeit, Pigment oder Trimethylamin zu bilden; pathogene Mikroben können ihre Virulenz einbüßen.

Die maximale Temperatur, die von Bakterien ertragen wird, wechselt selbst bei der nämlichen Spezies insbesondere mit dem morphologischen Zustand und dem Alter der Kulturen: Kolikulturen von 5—6 Stunden Alter gehen bei Erhitzung auf 53° nach 25 Minuten bereits zugrunde, 8—9 Stunden alte sind widerstandsfähiger.[5]) Genaue Angaben über die Bestimmung der

---

1) Benecke, W., Bau u. Leben d. Bakt. Leipzig u. Berlin 1912.

2) Vgl. namentlich Miehe, Selbsterhitzung des Heus. Jena 1906, dort weitere Literaturangaben; Georgevitch, P., *Bac. thermophilus Jivoini n. sp.* usw. (Zbl. f. Bakt. II, 1910, **27**, 150); J. Behrens in Lafars Handb. d. techn. Myk. 1907, **1**, 601; Nègre, L., Les bact. thermophiles (Bull. Inst. Pasteur 1912, **10**, 385).

3) Koch, A. u. Hoffmann, C., Üb. d. Verschiedenheit der Temperaturansprüche thermophiler Bakt. im Boden u. in künstl. Nährsubstr. (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **31**, 433).

4) Dieudonné, Beitr. z. Kenntn. d. Anpassungsfähigkeit d. Bakt. an ursprünglich ungünstige Temperaturverhältnisse (Arb. Kais. Gesundheitsamt, 1894, **9**).

5) Schultz, J. H. u. Ritz, H., Die Thermoresistenz junger und alter Koli-Bazillen (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1910, **54**, 283).

Tötungszeit von Sporen oder vegetativen Zellen bei A. MEYER.[1]) Einige für die Technik der Sterilisation wichtige Angaben wurden oben (S. 45) bereits zusammengestellt. SCHUT jr. erbrachte den Nachweis, daß beim Kochen unter erniedrigtem Druck Bakterien schon innerhalb der physiologischen Temperaturgrenzen zugrunde gehen[2]); die zellenzerstörende Wirkung des Kochens beruht vielleicht darauf, daß bei hohen Temperaturen sich Wasserdampfblasen im Innern der Zelle bilden.

Licht. — Nicht nur direkte Besonnung, sondern auch zerstreutes Tageslicht wirken entwicklunghemmend und tötend auf Bakterien, auch dann, wenn die Wärmestrahlen durch Vorschalten eines Alaunkristalls oder einer Wasserschicht oder Ferrophosphatlösung[3]) ferngehalten werden. Auch ultraviolettes Licht ist wirksam.[4]) Die desinfizierende Wirkung des Lichtes ist vielleicht insofern nur eine indirekte, als das eigentlich wirksame Agens das bei Belichtung gebildete Wasserstoffsuperoxyd ist.[5])

Der entwicklunghemmende Einfluß des Lichtes wird erhöht, wenn man dem Nährboden sehr geringe Mengen sensibilisierender Farbstoffe (z. B. Eosin s. o. S. 78) zusetzt (nach METTLER[6]) z. B. 1 : 10000); derselbe Autor stellte Untersuchungen über den hemmenden Einfluß der Belichtung der Nährböden vor der Infektion an.

Sporenbildung. — Sporenbildung tritt nicht ein, wenn die Bedingungen dem Wachstum der Bakterien anhaltend günstig bleiben; plötzliche Hemmung des Wachstums nach vorausgegangener guter Ernährung veranlaßt jederzeit vollständige Sporenbildung. Solche wachstumhemmende Stoffe, welche die Sporenbildung fördern, fand O. SCHREIBER[7]) in kohlensaurem Natrium, Magnesiumsulfat, Chlornatrium und destilliertem Wasser. „Erschöpfte“ Nährböden, auf welchen Sporenbildung eintritt, sind wohl weniger solche, in welchen alle Nährstoffe verbraucht sind, als diejenigen, welche durch wachstumhemmende Stoffwechselprodukte untauglich geworden sind.

Involutionsformen. — Übermäßig vergrößerte, blasig aufgetriebene, verschnörkelte und verkrüppelte Bakterienzellen bezeichnet man seit NÄGELI

1) Prakt. d. bot. Bakterienkde., Jena 1903, 127 ff.; vgl. auch oben S. 76 (Erzielung konstanter Temperaturen über 100°).

2) Üb. d. Absterben d. Bakt. beim Kochen unter erniedr. Druck (Zeitschr. f. Hyg. 1903, **44**, 323).

3) Vgl. ZSIGMONDI in WIEDEMANNS Annalen **49**, 531.

4) THIELE, H. und WOLF, K., Üb. d. Abtötung d. Bakt. durch Licht (Arch. f. Hyg. 1906, **57**, 29 und 1907, **60**, 29).

5) Vgl. DIEUDONNÉ a. a. O.

6) Experimentelles üb. d. bakterizide Wirkung d. Lichtes auf mit Eosin, Erythrosin und Fluoreszein gefärbte Nährböden (Arch. f. Hyg. 1905, **53**, 80).

7) Üb. die physiol. Bedingung. der endogenen Sporenbildung usw. Dissertation Basel 1896; BUCHNER, H., Üb. d. phys. Beding. d. Sporenbild. beim Milzbrandbazillus (Zbl. f. Bakt. I, 1896, **20**, 806); MATZUSCHITA, Z. Phys. d. Sporenbildung d. Bazillen usw. (Dissertation Halle a. S. 1902).

als Involutionsformen. Sie treten in alten Kulturen auf; auch bei ihrer Entstehung spielen die Stoffwechselprodukte zweifellos eine große Rolle. — Allgemein bekannt sind die voluminösen Involutionsformen der Essigbakterien, die bei allzu hoher Temperatur oder in übermäßig saurem Substrat gebildet werden.

Stoffwechselprodukte. — Wegen der Stoffwechselprodukte der Bakterien ist vor allem auf das im „Allgemeinen Teil" Mitgeteilte zu verweisen. Von den vielen z. T. für die Erkenntnis ihrer Physiologie und die Interessen der angewandten Biologie höchst bedeutungsvollen Stoffwechselprodukten der Bakterien sind hier nur diejenigen zu nennen, deren Nachweis oder deren Wirkungen in irgendwelchem Zusammenhang mit den Kulturmethoden stehen.

Alkali- und besonders Säurebildung in Bakterienkulturen sind ganz alltägliche Erscheinungen. Wird Zucker in einem Nährsubstrat geboten oder ein mehrwertiger Alkohol wie Glyzerin, Mannit oder dgl., so entstehen fast allgemein durch die Reduktionstätigkeit der Mikroben Säuren, über deren Nachweis und deren Bindung das früher Gesagte gilt. Schon 1 % Traubenzucker, ja selbst noch geringere Dosen führen bei vielen Bakterien zu einer so starken Säuerung des Substrats, daß diese zugrunde gehen[1]), während andere Organismen wie bekannt selbst starke Azidität vertragen können. Auf die Säurebildung folgt später vielfach Umschlagen der Reaktion ins Alkalische. Ammoniakbildung bezw. Produktion von Ammoniumkarbonat spielt in Bakterienkulturen eine um so größere Rolle, je kräftigere Eiweißzersetzung in ihnen vor sich geht. Besonders reichlich bilden die Harnstoffbakterien kohlensaures Ammoniak. Mitteilungen über den Einfluß der Reaktion auf das Aussehen der Kultur werden bei Besprechung der differentialdiagnostischen Nährböden zu geben sein.

Von weiteren Zersetzungsprodukten, die sich vom Eiweiß ableiten, ist vor allem das Indol zu nennen. Zu seinem Nachweis bedient man sich meist der SALKOWSKI-KITASATOschen Nitrosoreaktion: MORRIS[2]) empfiehlt, in 5 %iger Peptonnährbouillon die zur Prüfung vorliegenden Mikroben beim Temperaturoptimum wachsen zu lassen; man setzt alsdann zu je 10 ccm Nährlösung je 1 ccm 0,02 %ige wässerige Kaliumnitritlösung und dann einige Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zu[3]); bei Agarkulturen gießt man zuerst die Nitritlösung auf, gießt diese nach einigen Minuten wieder ab und setzt

---

1) Vgl. PETRUSCHKY, J., Bakterio-chemische Untersuch. (Zbl. f. Bakt. 1889, **6**, 625, 657; 1890, **7**, 1, 49). Ferner SMITH, TH., Üb. d. Bedeut. d. Zuckers in Kulturmedien f. Bakt. (Zbl. f. Bakt. I, 1895, **18**, 1).

2) MORRIS, M., Stud. üb. d. Prod. v. Schwefelwasserstoff, Indol u. Merkaptan bei d. Bakt. (Arch. f. Hyg. 1897, **30**, 304, 309).

3) Vgl. auch KITASATO, Die negat. Indolreakt. d. Typhusbaz. usw. (Zeitschr. f. Hyg. 1889, **7**, 515, 518); STEENSMA, F. A., Üb. d. Nachw. von Indol und die Bildung von Indol vortäuschenden Stoffen in Bakterienkulturen (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1906, **41**, 295); TELLE, H. u. HUBER, E., Krit. Betracht. üb. d. Meth. d. Indolnachw. usw. (ibid. 1911, **58**, 70).

dann H_2SO_4 zu. Ist Indol vorhanden, so tritt Rotfärbung ein (Bildung von Nitrosoindol). — Die von MORELLI vorgeschlagene Methode des Indolnachweises zeichnet sich vor allem dadurch aus, daß die Kulturen durch ihre Anwendung nicht zerstört werden. Oxalsäure wird heiß bis zur Sättigung in H_2O gelöst, Filtrierpapier damit getränkt, und ein Streifchen von diesem in die Atmosphäre der Kultur gehängt: ist Indol vorhanden, so färbt sich das Papier rot.[1]) Die Indolprobe läßt sich auch zur Diagnose verschiedener Mikroben verwenden: manche bilden erst spät Indol, andere schon nach wenigen Tagen u. dgl. m.

Über farbige Stoffwechselprodukte — Stigmente — vgl. das S. 183 Gesagte.

Das von ERDMANN und WINTERNITZ[2]) studierte Proteïnochromogen gibt mit Chlor oder Brom eine rotviolette Färbung (Proteïnochrom); Bakterienkulturen, die auf 5 % Peptonnährbouillon erwachsen sind, werden mit Chlorwasser auf diese Substanz geprüft. —

Viele Bakterien produzieren reichliche Mengen verschiedener Gase, unter welchen CO_2, H, H_2S, CH_4 und N die wichtigsten sind. Zur Prüfung auf etwaige Gasentwicklung bedient man sich eines Gärungskölbchens. Schwefelwasserstoff wird namentlich bei Peptonernährung reichlich gebildet.[3]) — Anleitung zur Analyse des von Bakterien gelieferten Gases gibt A. MEYER.[4]) Feste Nährböden werden, wenn in ihnen gasbildende Mikroben sich entwickeln, von den Gasblasen zerrissen.

Von den Fermenten, deren Wirkung auf das Aussehen einer Bakterienkultur den größten Einfluß hat, sind die proteolytischen, gelatineverflüssigenden am weitesten verbreitet. Seltener sind Bakterien, welche Agar verflüssigen, wie der marine *Bac. gelaticus*.[5]) Auch Serum kann verflüssigt werden.[6])

Ausführlich ist über Fermente und ihren Nachweis durch bestimmte Kulturmethoden schon im „Allgemeinen Teil" berichtet worden.

---

1) MORELLI, G., Üb. ein neues Verfahren z. Nachweis v. Indol auf Nährsubstraten (Zbl. f. Bakt. I, Orig., 1909, **50**, 413).

2) Üb. das Proteïnochrom, eine klinisch u. bakteriol. bisher nicht verwertete Farbenreaktion (Münchn. mediz. Wochenschr. 1903, 982).

3) Über den Nachweis mit MOHRschem Salz [$SO_4FeSO_4(NH^4)_2$] vgl. BEYERINCK, Über *Spirillum desulfuricans* als Ursache v. Sulfatreduktion (Zbl. f. Bakt. II, 1895, **1**, 1); STAGNITTA-BALISTRERI (Verbreitung der Schwefelwasserstoffbildung unter der Bakt., Arch. f. Hyg. 1893, **16**, 10) nimmt Eisensaccharat; MORRIS (Stud. üb. d. Produkt. v. Schwefelwasserstoff, Indol u. Merkaptan bei Bakt., Arch. f. Hyg. 1897, **30**, 304) gibt auf 1 l Nährlösung 1 g Bleizucker (Bleiazetat).

4) Praktikum der botan. Bakterienkunde, Jena 1903, 110.

5) GRAN, H. H., Hydrol. des Agars durch ein Enzym (Bergens Mus. Aarbog 1902, No. 2). Vgl. auch PANEK, K., Bakt. u. and. Stud. üb. die Barszcz genannte Gärung der roten Rüben (Bull. Acad. Sc. Cracovie, 1905, janv.; betrifft *Bact. betae viscosum*) und BIERNACKI, *Bact. Nenckii*, BIERN., ein neuer, den Agar verflüss. Mikroorg. (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **29**, 166).

6) Vgl. REMLINGER, P., S. un bac. liquéfiant rapidement le sérum coagulé (C. R. Soc. Biol. 1911, **70**, 168).

Stoffwechselprodukte, welche wachstumhemmend oder wachstumfördernd wirken, und deren chemischer Charakter noch unbekannt ist, kommen bei den Bakterien unzweifelhaft in der gleichen Verbreitung vor wie bei den Pilzen, sind aber noch für beide Organismengruppen gleich schlecht erforscht.

Rahn[1]) stellt für einige Organismen fest, daß Nährlösung, welche die Stoffwechselprodukte des betreffenden Bakteriums enthält, bei erneuter Aussaat sein Wachstum besser fördert als frische Nährlösung. Der fragliche Stoff wird durch Kochen nicht zerstört und geht nicht durchs Tonfilter; neben diesen wachstumfördernden Stoffen kommen noch andere Stoffwechselprodukte zustande, welche gerade im entgegengesetzten Sinn wirken. Sie werden durch Erhitzen (60—100°), sowie durch Belichtung zerstört, so daß man alte Nährlösungen durch Kochen wieder brauchbar machen kann. Auch Eijkman beobachtete, daß die Bakterien thermolabile, wachstumhemmende Stoffe produzieren.[2])

Diese wenig erforschten Substanzen haben nicht nur große theoretische Bedeutung, sondern werden zweifellos auch für die Praxis der Mikroorganismenkultur die größte Bedeutung gewinnen. Bei der Aussaat von Bakterien in neu angelegte Kulturen überträgt man nicht nur Organismen, sondern auch ein Pröbchen von den wachstumfördernden Substanzen; vielleicht hängt es damit zusammen, daß bei reichlicher Aussaat die Kulturen — caeteris paribus — oft besser angehen als bei spärlicher.

Die bekannte Erscheinung, daß Ausstriche auf schräg erstarrtem Nährboden auch dann an dem unteren Ende zu üppigeren Vegetationen führen als an dem oberen, wenn an letzterem reichlicheres Aussaatmaterial abgestreift worden ist, wird auf die Wirkung wachstumhemmender Stoffe zurückzuführen sein, die oben, wo der Nährboden nur in dünner Schicht vorhanden ist, ihn schneller vergiften als unten.[3])

Die problematischen Stoffe wirken aber nicht nur auf diejenigen Organismen, welche sie produziert haben, sondern auch auf andere hemmend oder fördernd (Eijkman u. a.), ja es scheint, als ob die Produkte des einen den andern zur Produktion besonderer Stoffe anregen könnten (Nencki). Bleiben für die Zukunft gerade auf diesem Gebiete noch viele an Reinkulturen beobachtete Erscheinungen näher zu erforschen, so ist die Zahl der Aufgaben,

---

1) Über thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstumshemmung der Mikroorganismen (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1904, **37**, 436); Über natürliche Wachstumshemmung der Bakterien (ibid. I Orig., 1906, **41**, 367); daselbst weitere Literaturangaben.

2) Üb. d. Einfluß der Stoffwechselprodukte auf d. Wachstum der Bakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **16**, 417).

3) Betrachtungen und experimentelle Mitteilungen über die Schnelligkeit, mit der sich Bakterien vermehren, z. B. bei A. Godoy (Üb. d. Vermehrung der Bakt. in d. Kulturen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1909, **1**, 87; cf. Bull. Inst. Pasteur 1910, **8**, 782).

welche uns die „Mischkulturen" stellen, womöglich noch größer. NENCKI[1]) beobachtete, daß bei gleichzeitiger Aussaat von zwei Mikroben Stoffwechselprodukte entstehen, die in beiderlei Reinkulturen nicht gebildet werden[2]), daß manche Zersetzungsvorgänge schneller vor sich gehen, in anderen Fällen die Organismen sich gegenseitig hemmen. LODE[3]) isolierte einen „antagonistisch" wirkenden Mikrokokkus, der die verschiedensten neben ihm ausgesäten Mikroben selbst in einer Entfernung von 3 und mehr Zentimeter noch zu hemmen vermochte; der „antagonistisch" wirkende Stoff ist nach LODE dialysierbar. CANTANI u. a. beobachteten[4]), daß man das Wachstum gewisser Bakterien durch Zusatz anderer Mikroben fördern kann (Influenza, Gonokokkus)[5]).

Den Einfluß wachstumhemmender Stoffe auf die Sporenbildung demonstriert deutlich ein Versuch DE JAGERS; dieser Autor beobachtete, daß Bakteriensporen in derselben Nährlösung, in der sie gebildet werden, wieder keimen können, wenn man die Lösung kocht. Offenbar handelt es sich um giftige, thermolabile Stoffwechselprodukte, welche die Bildung von Sporen veranlassen, und nach deren Zerstörung die Nährlösung für das Wachstum der Bakterien wieder geeignet wird.[6])

Daß manche Stoffwechselprodukte selbst nach energischer Erhitzung (120 °) auf die Wachstumsform der Mikroben (*Bac. mycoides*) großen Einfluß haben können, haben NADSON und ADAMOVIC gezeigt.[7])

Giftwirkungen. — Daß Bakterien im allgemeinen gegen Säuren sehr empfindlich sind (Giftwirkung der H-Ionen), wurde schon (S. 162)[8]) hervorgehoben. Laugen (OH-Ionen) sind sehr viel weniger giftig; es gibt Bakterien, welche über 0,1 % KOH noch vertragen.[9]) Die hemmende Wirkung der Schwermetallverbindungen, die sich auf auxanographischem Wege erweisen läßt (Auflegen von Metall auf die Gelatineplatte), wurde bereits von ver-

---

1) Üb. Mischkulturen (Zbl. f. Bakt. 1892, **11**, 225).

2) Oben (S. 139) war zu erwähnen, daß gewisse Pilze bei verschiedener Ernährung ganz ungleichartige Fermente produzieren.

3) Experiment. Untersuch. üb. Bakterienantagonismus I (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1903, **33**, 196).

4) Vgl. z. B. CANTANI, A., Über die Verwertung von Bakt. als Nährbodenzusatz (Zbl. f. Bakt. 1900, **28**, 743; auch Zeitschr. f. Hyg. 1901, **36**, 37).

5) NEISSER, M., Über d. Symbiose d. Influenzabaz. (Deutsche mediz. Wochenschr. 1903, 463).

6) DE JAGER, Over nieming van Bacillensporen in dezelfde vloeistoff waarin ze zijn outstaan (Nedorl. tijdschr. voor Geneesk, 1907, ser. II).

7) NADSON, G. A. u. ADAMOVIC, S. M., Über die Beeinflussung der Entwicklung des *Bacillus mycoides* FLÜGGE durch seine Stoffwechselprodukte (Bull. jard. imp. bot. St. Pétersbourg 1910, **10**, 154; vgl. Zbl. f. Bakt. II, 1911, **31**, 287).

8) Vgl. besonders LINGELSHEIM, Beitr. z. Ätiol. des Milzbrandes (Zeitschr. f. Hyg. 1890, **8**, 201).

9) Literatur oben S. 163; ferner z. B. KITASATO, Üb. d. Verhalten d. Typhus- und Cholerabaz. zu säure- und alkalihaltig. Nährb. (ibid. 1888, **3**, 404).

schiedenen Autoren geschildert[1]); über die desinfizierende Wirkung der Schwermetallverbindungen vgl. S. 48. Ob sehr verdünnte Lösungen auch auf Bakterien wachstumfördernde Wirkung haben können, bedarf noch weiterer Erforschung. Über die Wirkung des Eosins vgl. NOGUCHI.[2]) Daß sich Bakterien an Gifte gewöhnen können, zeigte z. B. EFFRONT.[3])

Diagnostische Nährböden. — Diese geben dem Forscher ein bequemes Mittel an die Hand, auch ohne Zuhilfenahme des Mikroskops bestimmte Bakterienspezies an ihrem Verhalten den Nährböden gegenüber zu erkennen. Für die Untersuchung und Unterscheidung gewisser pathogener Bakterien haben sich diese Nährböden vielfach gut bewährt. Ich nenne hier einige, die zur Unterscheidung der Typhus- und Kolibakterien dienen.[4])

Für DRIGALSKI-CONRADIS Lakmusagar[5]) kommen zu 1000 g Fleischwasser:

10 g Pepton WITTE
10 „ Nutrose
5 „ Kochsalz
30 „ Agar
130 ccm KUBEL-TIEMANNsche Lakmuslösung[6]), ferner
15 g Milchzucker
10 ccm Kristallviolettlösung (0,1 %; frisch bereitet).

Die Alkaleszenz soll der einer 0,04 %igen Sodalösung gleichkommen. Die Nutrose fördert das Wachstum der Typhusbakterien; das Kristallviolett hemmt die Entwicklung der Luftkeime. Die Kolikolonien werden auf diesem Nährboden nach 14—16 Stunden (37°) rot und undurchsichtig, die Typhuskolonien blau, tautropfenartig.

---

1) Einige Literatur stellte CZAPEK zusammen (Biochemie d. Pfln. 1905, **2**, 909).

2) NOGUCHI, H., On the inbibitory infl. of eosin upon sporulation (Journ. exp. med. 1908, **10**, 30).

3) Infl. des comp. du fluor s. l. levures de bières (C. R. Acad. Sc. Paris 1894, **118**, 1420; auch **119**, 169); KOHN, E., Weitere Beob. über saccharophobe Bakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **17**, 446; stellte die Anpassungsfähigkeit der saccharophoben Bakterien an Zucker fest). [Während des Druckes erscheint ein wichtiger Beitrag zur Lehre von der Desinfektion: EIJKMAN, C., Unters. üb. d. Reaktionsgeschwindigkeit d. Mikroorganismen (Fol. Microbiologica 1912, **1**)].

4) Zusammenfassender Bericht z. B. bei KATHE u. BLASIUS. Vergl. Unters. üb. d. Leistungsfähigkeit älterer u. neuerer Typhusnährböden (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1909, **52**, 586).

5) v. DRIGALSKI-CONRADI, Über ein Verfahren z. Nachweis der Typhusbazillen (Zeitschr. f. Hyg. 1902, **39**, 283); LIPSCHÜTZ, B., Üb. die bakt. Diagn. des *Typh. abdom.* mit Hilfe des v. D.-C.schen Nährbodens u. d. Agglutination (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1904, **35**, 798); PETKOWITSCH, D. S., Beitr. z. Frage des diagnost. Wertes einiger Nährböden f. d. Typhusdiagnose (ibid. 1904, **36**, 304). Näheres bei GÜNTHER, Einführung, 6. Aufl., 532.

6) Zu beziehen durch C. A. F. KAHLBAUM, Berlin SO.

Endos Fuchsinagar[1]) erhält man durch Zusatz von

1 % Milchzucker
0,5 % alkohol. Fuchsinlösung
2,5 % Natriumsulfitlösung (10 %)
1 % Sodalösung (10 %)

zu 3 %igem Nähragar. Durch das Natriumsulfit wird das Fuchsin reduziert und entfärbt. Typhuskolonien wachsen auf Endoschem Boden farblos, Kolikolonien schön rot.[2])

Rothberger[3]) benutzte die entfärbende Wirkung des *Bact. coli* auf Safranin und besonders Neutralrot. Zu 10 ccm Agar werden 3—4 Tropfen einer wässerigen konzentrierten Neutralrotlösung zugesetzt; unter dem Einfluß der Kolibakterien stellt sich kräftige Fluoreszenz des Nährbodens ein. Der Rothberger-Schefflersche Nährboden enthält[4])

0,3 % Traubenzucker
1 ccm konzentrierte Neutralrotlösung
100 „ Nähragar.

Der Glukosezusatz beschleunigt den Eintritt der Reaktion beträchtlich. Heller[5]) nimmt Gelatine. — Die Wirkung der Kolikulturen auf Neutralrotböden beruht auf Reduktion und gleichzeitiger Ammoniakbildung.[6])

Malachitgrün wurde zur Differentialdiagnose zuerst von Löffler, dann von Lentz und Tietz, sowie von Padlewski u. a. verwendet. Der vom letztgenannten Autor[7]) empfohlene Nährboden wird folgendermaßen hergestellt: zu 3%igem Nähragar (Fleisch oder Liebig) kommen 2% Pepton, 3 % Ochsengalle und 1 % chemisch reiner Milchzucker; in Kölbchen wird der Nährboden fraktioniert sterilisiert, und zu je 100 ccm werden bei 60—65° zugesetzt

1 %ige wässerige Malachitgrünlösung (Höchst) . . . . . 0,5 ccm
Galle . . . . 0,5 „
10 %ige wässerige Lösung von schwefligsaurem Natrium (pur. pro anal.) . . . . 0,75—1,00 ccm.

1) Üb. ein Verfahren z. Nachweis des Typhusbazillus (Zbl. f. Bakt. I, 1904, **35**, 109); Marschall, F., Die Bedeutung des Endoschen Nährbod. f. d. bakteriol. Typhusdiagnose (ibid. 1905, **38**, 347) u. v. a.

2) Merck bringt „Endo-Tabletten" in den Handel (Soda, Natriumsulfit u. Fuchsin): auf je 100 cc neutralen Agar eine Tablette.

3) Differential-diagnostische Untersuch. m. gefärbten Nährböden (ibid. I, 1898, **24**, 513).

4) Scheffler, W., Das Neutralrot als Hilfsmittel z. Diagnose des *Bact. coli* (ibid. I, 1900, **28**, 199); Oldekop, A.. Eine Modifik. des R.-Sch.schen Neutralrotbodens (ibid. I, Orig., 1904, **35**, 120) u. v. a.

5) Die Rothbergersche Neutralrotreaktion auf Gelatine bei 37° (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1905, **38**, 117).

6) Vgl. Guerbet, M., Etude de la réaction du rouge neutre au point de vue chimique (C. R. Soc. Biol. 1911, **70**. 514).

7) Padlewski, L., Eine neue Anwendungsmethode des Malachitgrünagars zum Nachw. v. Baz. d. Typhusgruppe (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1908, **47**, 540; vgl. auch Megele, ibid. 1909, **52**, 616).

Ohne Sterilisation wird der Agar in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren nimmt er ein durchsichtig gelbes Aussehen an. Der Gallegehalt fördert das Wachstum der Typhusbakterien, deren Kolonien zuerst farblos bleiben, dann goldgelb und durchscheinend aussehen, während die Säurebildner grün wachsen.

Weitere diagnostische Nährböden enthalten Gifte, welche von verschiedenen Mikroorganismen den minder widerstandsfähigen in seiner Entwicklung hemmen, den andern zum Wachstum kommen lassen. ROTH[1]) z. B. gibt zu Fleischwasser ca. $\frac{1}{2}$ % Koffeïn, das nur den Typusbazillus zur Anreicherung kommen läßt und nicht die Kolibakterien. —

Noch zahlreiche andere Substanzen hat man zu diagnostischen Nährböden verwendet, so z. B. auch die aus Pflanzen (*Salix, Populus, Citrus, Arbutus*) gewonnenen Glykoside.[2])

Variabilität, Rassenbildung. — Werden Bakterien mehr oder minder lange Zeit unter Bedingungen gehalten, welche ihrer Entwicklung nicht günstig sind, so tritt degenerative Veränderung ein: bei allzu langem Aufenthalt auf künstlichen Nährböden, nach Zusatz von Giften u. a. verlieren z. B. pathogene Mikroben den natürlichen Grad ihrer Virulenz, den sie aber unter optimalen Lebensbedingungen, d. h. bei Passage durch einen geeigneten Tierkörper, wieder erwerben. Um degenerative Veränderungen handelt es sich wohl auch, wenn Bakterien z. B. ihre Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, verlieren, oder wenn *Bac. prodigiosus* infolge fortgesetzter Kultur auf Agar kein Pigment mehr bildet; nach Überimpfen auf Kartoffel werden seine Kulturen wieder farbig.[3]) Auch allzu hohe Temperatur macht denselben Mikroorganismus farblos; bei niedrigerer Temperatur kehrt sein normales Aussehen wieder zurück.[4])

Versuche mit *Bacillus prodigiosus, Staphylococcus pyogenes* und *Myxococcus sp.* haben gezeigt, daß unter dem Einfluß verschiedenartig variierter Kulturbedingungen (Zusatz von Cu-, Co-, Cd-, Cr-Salzen u. a. m.) nicht nur „Modifikationen", d. h. nicht vererbbare Abweichungen vom ursprünglichen Typ, sondern auch konstant bleibende Mutationen erzielt werden können.[5])

Die Kultur eines in den Formenkreis des *Bact. coli* gehörigen Organismus auf ENDO-Agar führte zu der Beobachtung, daß neben den farblosen Kolonien der zur Laktosevergärung nicht befähigten Mikroben rote Anhäufungen von Bakterien heranwachsen, also Organismen, welche Laktose

1) Vers. üb. d. Einwirk. d. Trimethylxanthins auf d. *Bact. typhi* u. *coli* (Arch. f. Hyg. 1904, **49**, 199); vgl. auch GAEHTGENS, N., Über die Erhöhung der Leistungsfähigkeit des ENDOschen Fuchsinagars durch d. Zusatz v. Koffeïn (Zbl. f. Bakt. I, 1905, **39**, 634).

2) MASSI, V., Modo di vegetare del bact. coli su alcuni terreni di cultura con glucosidi (Riv. di ig. e di san. pubbl. 1911, **22**, 101; vgl. Bull. Inst. Pasteur 1911, **9**, 971).

3) MIGULA, System d. Bakt., **1**, 226.

4) Theoretisches bei DETTO, Theorie d. direkten Anpassung, Jena 1904, 97.

5) WOLF, FR., Üb. Modifikationen u. exper. ausgelöste Mutationen v. *Bac. prodig.* u. and. Schizophyten (Zeitschr. f. ind. Abstammungs- u. Vererbungslehre 1909, **2**, 90).

vergären. Die Bakterien, welche die roten knopfähnlichen Sekundärkolonien bilden, behalten ihr neu erworbenes Gärvermögen auch dann, wenn sie auf laktosefreiem Medium weiterkultiviert werden. Der Auffassung, daß es sich bei derartigen Erscheinungen um „Mutation“ im Sinne DE VRIES' handele, wird keineswegs von allen Autoren beigepflichtet.[1])

Bei wiederholtem Überimpfen von einer Gelatinekultur auf die andere erleiden viele Bakterien eine deutliche Veränderung, deren auffälligstes Symptom in ihrer Asporogenität liegt. Asporogene Rassen, d. h. solche, welche keine Sporen mehr bilden, sind besonders beim Milzbrandbazillus (*Bacillus anthracis*) beobachtet worden.[2]) Zusatz von Giften (Kaliumbichromat[3]), Phenol[4])) beschleunigt ihr Erscheinen. — Daß bei wiederholtem Überimpfen ganz allgemein das Vermögen zu reichlicher Sporenbildung verloren geht, beruht nach BEYERINCK[5]) darauf, „daß man ohne bestimmte Fürsorge stets mehr vegetative Stäbchen wie Sporen überimpft und viele dieser Stäbchen das Vermögen zur Sporenbildung vollständig verlieren. Wird das übergeimpfte Material zuvor pasteurisiert, so daß nur Sporen zur Aussaat kommen, so bleibt die Sporenbildung und deshalb die übergeimpfte Kultur völlig konstant.“

Ob die asporogenen Rassen der Bakterien ohne weiteres mit den der Hefen gleichzusetzen sind, scheint fraglich. Bei jenen liegt vielleicht doch nur eine „Abschwächung“ vor, die für die sporenlosen Hefen in Anbetracht ihres von HANSEN konstatierten schon 17jährigen üppigen Wachstums sich kaum annehmen läßt.[6])

Myxobakterien.[7]) Ihre Verbreitung ist offenbar auch in Deutschland viel größer, als bisher gewöhnlich angenommen wurde. QUEHL, der die Umgegend von Berlin nach ihnen durchforschte, spricht von dem großen Reichtum des Kaninchenmistes an Myxobakterien. THAXTER nennt für Nordamerika *Myxococcus rubescens, Chondromyces*

---

1) Literaturnachweise und Kritik z. B. bei BURRI, R., Üb. scheinbar plötzliche Neuerwerbung eines bestimmten Gärvermögens durch Bakt. der Koligruppe (Zbl. f. Bakt. II, 1910, **28**, 321), PRINGSHEIM, H., Variab. nied. Organismen. Berlin 1910; BENECKE, Bau u. Leben d. Bakt. Berlin u. Leipzig 1912, 214ff.

2) Vgl. z. B. BEHRING, Beitr. z. Ätiol. d. Milzbrandes (Zeitschr. f. Hyg. 1889, **7**, 174); FISCHER, A., Vorlesungen über Bakterien. 2. Aufl., S. 50, Jena 1903.

3) CHAMBERLAND u. ROUX, Atténuation de la virule de la bact. charb. etc. (C. R. Acad. Sc. Paris 1883, **96**, 1088, 1090).

4) ROUX, Bactéridie charbonneuse asporogène (Ann. Inst. Pasteur 1890, **4**, 25).

5) Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien (Zbl. f. Bakt. II, 1901, **7**, 45).

6) Für die asporogene Rasse des Gasphlegmonenbazillus zeigte PASSINI (Üb. fäulniserregende anaërobe Bakt. etc., Zeitschr. f. Hyg. 1905, **49**, 135, 144), daß beim Überimpfen von Zuckeragar auf Eiweißnährböden die Asporogenität ihr Ende findet. Vgl. auch GRASSBERGER (a. a. O.).

7) THAXTER, On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes (Botan. Gaz. 1892, 389); Further observations on the M. (ibid. 1897, 395); Notes on the M. (ibid. 1904, 405); BAUR, E., Myxobakterienstudien (Arch. f. Protistenkde. 1904, **5**, 92); QUEHL, A., Untersuch. üb. die Myxobakterien (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **16**, 9).

aurantiacus und *M. virescens* als häufigste Formen, QUEHL für Deutschland nächst *M. rubescens Polyangium fuscum, M. virescens* und *M. coralloides*.

Wie BAUR und QUEHL feststellten, liegt das Temperaturminimum für Myxobakterien bei 17—20° C, das Temperaturoptimum ziemlich hoch — etwa bei 35° C. Hält man Kaninchenmist u. dgl. gut benetzt im Thermostaten bei 35° C, so werden die anderen Organismen, deren Keime der Mist birgt, in der Entwicklung gehemmt, und die Myxobakterien gewinnen die Oberhand. Sie können dann isoliert und auf andere Nährböden übergeimpft werden.

Als künstliche Nährböden sind Mist, Mistagar, Peptonagar und besonders Kartoffelextraktagar (THAXTER) geeignet; Mist darf nach VAHLE[1]) nur im Dampftopf sterilisiert werden. Die Früchte stehen zuweilen in Hexenringanordnung.

Heubazillen. Unter den aus Heu isolierbaren Bakterien[2]) ist *Bacillus subtilis* der bekannteste. Dank der Resistenz seiner Sporen leicht rein zu gewinnen durch Kochen eines Heuinfuses: Optimum 36°, aërob, verflüssigt Gelatine. Auf flüssigen Nährböden Kahmhaut. Nach Erschöpfung des Substrats Bildung von Sporen, deren Keimung gut zu beobachten ist. Wächst auf den üblichen Nährböden wie Kartoffel, Gelatine, Agar.[3])

Kartoffelbazillen begegnen dem Bakteriologen sehr häufig auf mangelhaft sterilisierten Kartoffeln: die Sporen der Kartoffelbazillen sind gegen Hitze sehr resistent. Am häufigsten ist *Bacillus mesentericus vulgatus*, der auf Kartoffeln schleimige weiße Kolonien bildet; *B. mesentericus fuscus* ist ihm ähnlich, bildet aber gelbe oder braune Kolonien.[4]) Aërob, verflüssigt Gelatine.

Wasserbakterien, eine bunte Schar von Mikroben, die namentlich als Bewohner und Verunreiniger des Trinkwassers eine große praktische Bedeutung haben. Bei seiner Untersuchung handelt es sich in erster Linie um Züchtung der in der Volumeneinheit des Wassers vorhandenen Keime. Man fängt Proben des Wassers in trocken sterilisierten Gefäßen auf und entnimmt den Wasserproben sobald wie möglich das Material zum Plattengießen. Da Bakterien der verschiedensten Art auf einer Platte nebeneinander zur Entwicklung gebracht werden sollen, müssen Bedingungen angestrebt werden, welche möglichst vielen Arten die Entwicklung ermöglichen; bei vergleichenden Untersuchungen muß namentlich der Grad der Alkaleszenz stets derselbe sein; vgl. z. B. das oben (S. 163) gegebene Rezept. HESSE und NIEDNER[5]) benutzen HEYDEN-Agar von folgender Zusammensetzung:

1000 ccm destill. Wasser
12,5 g Agar
7,5 „ HEYDEN-Nährstoff.

---

1) VAHLE, C., Vergleich. Unters. üb. d. Myxobakt. u. Bakteriaceen (Zbl. f. Bakt. II, 1909, **25**, 178); genaue Angaben über Herstellung der Nährböden.

2) Über die Bakterienflora des Heus vgl. MIEHE, Die Selbsterhitzung des Heus, Jena 1906.

3) Literatur bei ZOPF, Die Spaltpilze, 3. Aufl. 1885, 74; BREFELD, Bot. Unters. üb. Schimmelpilze, 4. Heft, Leipzig 1881.

4) Weiteres über Kartoffelbazillen z. B. bei FLÜGGE, Mikroorganismen, 2. Aufl. 1886, 321.

5) Die Methodik der bakteriolog. Wasserdiagnostik (Zeitschr. f. Hyg. 1898, **29**, 454).

Über die Wasservibrionen (Anreicherung, Isolierung) vgl. KOCH.[1]) Unter den Wasserbakterien befinden sich verschiedene, die auch bei der folgenden Gruppe einzureihen sind.

Pigmentbakterien lassen sich ebenso leicht aus der Luft auffangen (*Sarcina lutea*, seltener *S. aurantiaca*), wie aus Wasser isolieren („fluoreszierende" Bakterien); der bekannteste Vertreter der Gruppe ist der *Micrococcus prodigiosus*, der Pilz der „blutenden Hostie", der auf Gebäck, Kartoffeln u. a. gelegentlich auftritt. Wächst aërob, besonders auf Kartoffeln mit prächtiger Färbung. Auf diesem Substrat bildet *M. prodigiosus* reichlich Trimethylamin; auf eiweißhaltigen festen Nährböden bleibt die Bildung des letzteren aus.[2]) Über die Bedeutung bestimmter Nährstoffe für die Pigmentbildung haben verschiedene Autoren sich geäußert. Mg spielt nach ihren übereinstimmenden Angaben eine besondere Rolle[3]): nach BENECKES Untersuchungen (s. o.) sind bescheidene Dosen von Mg für das Wachstum der Bakterien unerläßlich, Pigmentbildung aber setzt größere Mengen von Mg voraus als Wachstum. THUMM gibt an (a. a. O.), daß *Bacillus syncyaneus*, der die Erscheinung der blauen Milch hervorruft, bei Ernährung mit zitronensaurem Ammoniak nur Synzyanin, in Asparaginlösung nur Fluoreszin, in milchsaurem Ammonium beides bildet. Weiterhin haben einige Autoren auf die Bedeutung von S und P aufmerksam gemacht (0,001 % Magnesiumsulfat oder 0,001 Natriumphosphat nach JORDAN).[4]) Vgl. ferner LEPIERRE, BOEKHOUT und OTT DE VRIES[5]) u. a.

Die grünen Kristalle, die *Bacillus chlororaphis* im Nährsubstrat ausfallen läßt („Chlororaphin") entstehen am reichlichsten bei Kultur auf folgendem Medium[6]):

Wasser	100 g
Asparagin	0,7 „
Glyzerin	2,5 „
Kaliumphosphat	0,1 „
Magnesiumsulfat	0,5 „
Chlorkalzium	0,04 „
Eisensulfat	0,01 „

Über farblose Rassen, insbesondere des Prodigiosus, s. o. Die Farbstoffe der Pigmentbakterien verhalten sich auf den Nährböden verschieden: das „Bakteriofluoreszin"

1) KOCH, R., Üb. d. augenblickl. Stand der bakt. Choleradiagnose (Zeitschr. f. Hyg. 1893, **14**, 319, 338).

2) ACKERMANN, D. u. SCHÜTZE, H., Üb. Art u. Herkunft d. flücht. Basen v. Kulturen des *Bact. prod.* (Arch. f. Hyg. **73**, 145).

3) Vgl. z. B. THUMM., Beiträge z. Kenntn. d. fluoresz. Bakt. (Arb. bakteriol. Inst. Karlsruhe 1895, **1**).

4) The production of fluorescent pigment by bacteria (Botan. Gaz. 1899, **27**, 19), daselbst weitere Literaturangaben. Vgl. auch NIEDERKORN, Vergleich. Unters. üb. die verschied. Varietäten des *Bac. pyocyaneus* und des *B. fluorescens liquefaciens* (Dissertation, Freiburg i. S. 1898).

5) LEPIERRE, Fonction fluorescigène des microbes (Ann. Inst. Pasteur 1895, **9**, 643), bestreitet den Einfluß der Phosphate, den GESSARD [a. a. O. 1892, **6**, 801] betont hatte; BOEKHOUT u. OTT DE VRIES, Üb. einen neuen chromog. Bac. (ibid. II, 1898, **6**, 497); *Bac. fuchsinus* entwickelt seinen charakteristischen Metallglanz am besten auf 1 % Pepton und 0,5 % Natriumtartrat.

6) LASSEUR, PH., Le *Bac. chlororaphis.* — Infl. du fer sur la production de la chlororaphine (C. R. Soc. Biol. 1911, **70**, 154).

ist wasserlöslich und verbreitet sich im Nährboden durch Diffusion, „Prodigiosin" ist unlöslich in Wasser. Näheres über die Biologie der Pigmentbakterien bei BEYERINCK, NICOLLE[1]), BENECKE (a. a. O. 1912) u. a.

Fäulnisbakterien, eine außerordentlich reichhaltige Gruppe von Organismen, welche Proteïnstoffe tierischer oder pflanzlicher Provenienz zersetzen. Wir verschaffen uns solche aus Fleischsaft, aus rohem Eiweiß oder aus Wasser, in welchem reife gelbe Erbsen gewässert worden sind. Die Flüssigkeiten werden der Luftinfektion ansgesetzt und aërob oder anaërob der weiteren Entwicklung überlassen. Zum Isolieren und Kultivieren isolierter Formen sind Fleischgelatine, Würzegelatine usw. geeignet, Gelatine wird verflüssigt; manche Fäulnisbakterien können nur Albumosen und Pepton verarbeiten, keine Albumine. Übrigens kommen zahlreiche Fäulnisbakterien auch mit Amidoverbindungen aus. Die häufigste Form ist *Proteus vulgaris*.[2]) Über „schwärmende Inseln" und „Spirulinen" der Proteuskulturen s. o. S. 169. — Spontan als Verunreiniger der Kulturen tritt zuweilen der in Erde weit verbreitete anaërobe *Bacillus oedematis maligni* auf (Eiweißzersetzung unter auffälliger Gasbildung).

Fettspaltende Bakterien. — SÖHNGEN nahm zur Anreicherung fettspaltender Organismen einen Nährboden von folgender Zusammensetzung:

Leitungswasser	100 ccm
fein verteiltes Fett . . .	0,5 g
$CaCO_3$	0,5 „
K_2HPO_4	0,5 „
$MgNH_4PO_4$	0,1 „.

Als Fett bewährte sich namentlich der (bei 55° schmelzende) Rückstand der Margarinebereitung (*suif pressé*).[3]) Fettspaltende Mikroben fand SÖHNGEN sehr reichlich im Humus (10 000 Bakterien auf 1 g) oder Milch (180—20 000 auf 1ccm). Bei 18—25° C entwickelten sich bei Aussaat von Erde fettspaltende Mikrokokken, Fluoreszenz-Bakterien und *Bact. punctatum* aërob, bei 30—37° C *Bact. lipolyticum* α, β, γ und δ.

Fäcesbakterien. — Aus menschlichen Fäces leicht zu isolieren ist das in ihnen stets vorhandene *Bacterium coli commune*. Man verteilt eine Probe des Stuhls in Nährgelatine und gießt Platten. Wächst auf Kartoffeln, in Nährbouillon usw., bringt Milch zum Gerinnen, gedeiht noch bei 46°.[4]) Auf zuckerreichen Nährböden geht — wegen zu starker Säuerung des Substrats (s. o.) — *B. coli* bald zugrunde; Trauben- und Milchzucker werden unter Gasbildung (CO_2 und H) vergoren. Gelatine wird nicht verflüssigt; auf peptonreichen Böden Indolentwicklung. Über das Verhalten auf „diagnostischen" Nährböden und die Unterscheidung von Typhus siehe oben S. 178.

---

1) BEYERINCK, Die Lebensgeschichte einer Pigmentbakterie (Bot. Zeitg. 1891, **49**, 750); MARSHALL WARD, A violet bacillus (Ann. of Bot. 1898, **12**, 59); NICOLLE, Grundz. d. allg. Mikrobiolog. 1901, 83; HEFFERAN, M. Compar. a. exper. study of bacilli produc. red pigment (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **11**, 311).

2) HANSEN, G., Üb. Fäulnisbakt. u. deren Beziehungen z. Septicaemie. Leipzig 1885. Spätere Literatur bei SALUS, G., Z. Biol. d. Fäulnis (Arch. f. Hyg. 1904, **51**, 97).

3) SÖHNGEN, N. L., Fat-splitting by bacteria (Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam 1910, 667).

4) Vgl. z. B. NEUMANN, G., Nachweis des *B. c.* in d. Außenwelt unter Zuhilfen. d. EIJKMANschen Meth. (Arch. f. Hyg. 1906, **59**, 174).

Essigbakterien. — Hauptfundgrube sind die Hobelspäne, welche in Essigfabriken das Essiggut überrieselt; vorzugsweise reichlich tritt auf ihnen *Bacterium aceti* auf (BEYERINCKS Schnellessigbakterien).[1]) Läßt man alkoholhaltige Flüssigkeiten wie Bier an der Luft stehen, so bildet sich bei ihnen (besonders im Thermostaten bei 30—35°) eine aus *Bact. rancens* bestehende Kahmhaut (Bieressigbakterien). Alle Arten sind aërob. Auf Bier lassen sich Essigbakterien leicht kultivieren; bei gleichzeitiger Aussaat von *B. aceti* und *B. rancens* gewinnt letzteres den Vorsprung. Umgekehrt entwickelt sich *B. aceti* üppig auf folgender Nährlösung, die BEYERINCK aus

100	g	Leitungswasser
3	„	Alkohol
0,05	„	Ammonphosphat und
0,01	„	Chlorkalium .

herstellt. Die im Leitungswasser enthaltenen Stoffe sind für das Gedeihen der Bakterien von großer Bedeutung, so daß jenes nicht ohne weiteres durch destilliertes Wasser ersetzt werden darf. *B. rancens* entwickelt sich auf dieser Nährlösung nicht. — Über die Ansprüche der Bakterien auf N- und C-Versorgung vgl. besonders HOYER. HENNEBERG[2]), der verschiedene Rezepte für Nährlösungen gibt, nennt unter anderem auch Hefewasser (7 Teile Hefe in 100 Teilen Wasser ausgekocht), verschiedene zuckerhaltige Medien (Bierwürze, Bierwürzegelatine, Traubenzuckergelatine) usw. — Auf zuckerhaltigen Lösungen (Rohrzucker, Traubenzucker), welchen Pepton oder Asparagin als N-Quelle beigegeben ist, produzieren verschiedene Essigbakterien sehr reichlich Schleim und Zellulose. Besonders *Bact. xylinum,* welches ebenfalls in Essigfabriken anzutreffen ist, zeichnet sich durch Bildung kräftiger Zellulosedecken aus. Über *Bacterium Pasteurianum,* welches BEYERINCK auf Biergelatine kultivierte, und an dessen Kolonien er „Ausläufer" entstehen sah, deren Individuen mit Jod nicht die für die Spezies charakteristische Blaufärbung gaben, vgl. die zitierte Abhandlung. — Die Involutionsformen der Essigbakterien zeichnen sich durch ihre Größe und Mannigfaltigkeit aus. Infolge der Kultur auf künstlichen Nährböden geht das Säuerungsvermögen der Essigbakterien zurück.

Zur Trennung der Essigbakterien von den Mykodermahefen benutzt BERGSTEN[3]) folgendes Verfahren: 6 sterile Gläschen werden mit 100 cm des Bieres beschickt, das zur Gewinnung der Mikroorganismen vorliegt; es werden zu den Bierproben

	0,	5,	10,	15,	20,	25 % Normalessigsäure zugesetzt
	|	|	|	|	|	| und
bei	40,	35,	30,	25,	20,	15° C gehalten.

In den schwach gesäuerten Proben entwickeln sich besonders die Essigsäurebakterien während die gegen hohe Temperaturen empfindlichen Hefen in den stark gesäuerten zur Entwicklung kommen.

---

1) Über die Arten d. Essigbakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1898, **4**, 209).

2) Weitere Unters. üb. Essigbakt. (ibid. 14). Vgl. außerdem HANSEN, E. CHR., Rech. s. l. bact. acétifiantes (Ann. de Microgr. 1894, Trav. labor. Carlsberg **3** u. **5**); HOYER, D. P., Bijdrage tot de Kennis van de Azijnbakterien (Proefschrift Leiden 1898; Zbl. f. Bakt. II, 1898, **4**, 867); Etudes s. l. bact. acétif. (Arch. Néerl. **2**, 1898).

3) Methode z. Trennung der Mycoderma v. d. Essigbakt. im Bier durch Anhäufung (Wochenschr. f. Brauerei, **33**).

Einen farbstoffbildenden Biermikroben der Essigbakteriengruppe fand Beyerinck in Bier und auf Eichenlohe (*Acetobacter melanogenum*).[1])

Milchsäurebakterien. — Sind in der Brennereimaische zu finden (*Bac. acidificans longissimus*), in der Milch (*Bact. lactis acidi* und *Bacillus acidi lactici*)[2]), im Yoghurt (*Bacterium caucasicum*). Fakultativ anaërob, verflüssigen Gelatine im allgemeinen nicht. Zur Reinkultur geht man von spontan sauer gewordener Kuhmilch aus und gießt Platten mit Gelatine, welche gärfähigen Zucker enthält (Traubenzucker, Milchzucker). Beyerinck kocht 20 g Hefe in 100 ccm Leitungswasser und stellt mit 5—10 % Traubenzucker und 8 % Gelatine den Nährboden her[3]); wird gleichzeitig Schlemmkreide beigegeben, so machen sich die säurebildenden Kolonien der Milchsäurebakterien durch Aufhellung der Kreidemischung auffällig (s. o. S. 82). Andere brauchbare Nährböden stellt man sich aus Milch her, z. B.

100	g	Molke (s. o.)
½	„	NaCl
1	„	Pepton (Witte)
10	„	Gelatine.

Über die Ansprüche, welche verschiedene Milchsäurebakterien an die Temperatur stellen, vgl. Beyerinck. *Bacillus aromaticus* wird von diesem Autor durch Aussaat von Bäckerhefe in Malz (anaërob bei 15—18°) und Überimpfung in sterilisierte Milch (25—30°) gewonnen. Azidität 3—5 ccm Normalsäure auf 100 ccm Milch.[4])

Buttersäurebakterien, weit verbreitete Organismen, welche aus Kohlehydraten Buttersäure oder andere Verbindungen der Butylreihe bilden.[5]) Anaërob. *Bacillus butyricus* (*Clostridium butyricum*, *Granulobacter saccharobutyricus*) läßt sich aus Erde, Mist, Milch und Käse u. a. gewinnen. Sporen nach dem Clostridiumtypus.

Eine „normale Buttersäuregärung" richten wir uns mit Beyerinck[6]) folgendermaßen ein. Man bringt in ein Kochkölbchen destilliertes Wasser mit 5 % Glukose und 5 % fein gemahlenem Fibrin, läßt den Brei sich absetzen und kocht kräftig, bis alle Luft entfernt ist. Während des Kochens infiziert man mit Gartenerde und stellt noch heiß das Kölbchen in den Thermostaten (35°). Durch das Erhitzen werden alle Keime außer den Sporen des *Granulobacter saccharobutyricus* und einigen anderen (Heubacillus usw.) abgetötet. Das Buttersäurebakterium drängt bald alle anderen zurück. Will man die Clostridiumform erhalten, so verfährt man nach Beyerinck ebenso mit folgender Lösung:

---

1) Beyerinck, M. W., Über Pigmentbildung bei Essigbakterien (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **29**, 169).

2) Zusammenfassender Bericht über Milchbakterien z. B. bei H. Weigmann in Lafars Handb. d. techn. Mykol. 1905, **2**, 48ff.

3) Verfahr. z. Nachw. d. Säureabsond. bei Mikrobien (Zbl. f. Bakt. 1891, **9**, 782). Vgl. auch Kalischer, O., Z. Biol. d. pepton. Milchbakt. (Arch. f. Hyg. 1900, **37**, 30); Boekhout u. de Vries, Üb. ein d. Gelatine verflüss. Milchsäurebakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **12**, 587).

4) Beyerinck, M. W., Fermentation lactique dans le lait (Arch. néerl. sc. exactes et nat. 2 sér. 1908, **13**).

5) Vgl. Beyerinck, Über die Butylalkoholgärung u. d. Butylferment (Verhandl. akad. Wiss. Amsterdam, 2. Sekt., 1. deel, 1893); Schattenfroh u. Grassberger, Üb. Buttersäuregärung (Arch. f. Hyg. 1900, **37**, 54 und folgende Bände).

6) Üb. d. Einrichtung einer normalen Buttersäuregärung (Zbl. f. Bakt. II, 1896, **2**, 699).

5 % Glukose oder Rohrzucker,
3 % präzipitiertes Kalziumkarbonat,
0,05 % Natriumphosphat,
0,05 % Magnesiumsulfat,
0,05 % Chlorkalium.

Es entwickeln sich Klostridien mit reichlich Granulose.

Zur Isolierung verfährt BEYERINCK nach folgender Methode: Man löst 5 % Rohrzucker und 5 % Gelatine in Leitungswasser und impft ein Reagensglas mit einer Spur der Gärungsmasse, — falls Sporen in dieser vorhanden sind, kann man die heiße Gelatine impfen; außerdem impft man mit einem sauerstoffbedürftigen Organismus, der keine Säure erzeugt (Heubacillus oder dgl.); — letzterer entwickelt sich an der Oberfläche, *Granulobacter* in den tieferen Schichten.

Zu den Buttersäurebakterien gehört auch das N-fixierende *Clostridium Pasteurianum*; siehe nächsten Abschnitt.

Stickstoffbindende Bakterien. — Im Boden sind bereits verschiedene Bakterien gefunden worden, die als Stickstoffbinder erkannt worden sind; wir beschränken uns auf die Behandlung der am weitesten verbreiteten und am besten erforschten Arten.

In jedem fruchtbaren Boden des Festlandes wie im Meere zu finden ist das aërobe großzellige *Azotobacter*.

A. chroococcum[1]) erhält BEYERINCK dadurch, daß er von

100 g Leitungswasser,
2 „ Mannit,
0,02 „ K_2HPO_4

eine dünne Schicht in einen Erlenmeyer bringt, mit 0,1—0,2 Gartenerde infiziert und bei 27—30° C. stehen läßt. Es ist empfehlenswert, das alkalische K_2HPO_4 zu nehmen. *Azotobacter* gehört zu BEYERINCKS oligonitrophilen Organismen; 10 mg KNO_3 pro l der Nährlösung hemmen seine Anreicherung bereits. In Reinkulturen zeigt sich, daß Mengen wie 0,1 % KNO_3 gut von ihm assimiliert werden. Solche erhielt BEYERINCK z. B. durch Überimpfen von den Bakterienhäuten aus der Gartenerdekultur auf einen Nährboden, der neben den genannten Stoffen 2 % Agar enthält.

Von manchen fremden Bakterien, in deren Gesellschaft *Azotobacter* aufzutreten pflegt, läßt sich dieses oft schwer trennen. Andererseits erleichtern die „symbiotischen" Beziehungen des *Azotobacter* zu makroskopischen Organismen unter Umständen seine Gewinnung: H. FISCHER[2]) übergießt Oszillarienrasen mit Mannit, BENECKE und KEUTNER[3]) fanden ihn an Meeresalgen haften.

Auf Reinkulturen der oben geschilderten Art erweist sich das Stickstoffbindevermögen des A. als sehr gering; will man kräftig N-assimilierende Kulturen erzielen, so bedarf es eines Zusatz von Humus — in Form von Bodenextrakt, als freie Säure oder in Form von K-, Na- oder Ca-salzen. KRZEMINIEWSKI[4]) kultiviert z. B. auf

---

1) Über oligonitrophile Mikroben (Zbl. f. Bakt. II, 1901, **7**, 561).

2) Über Stickstoffbakterien (Verh. naturhist. Vereins Rheinlande usw. 1905/06, **62**, 135); Über Symbiose v. A. m. Oszillarien (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **12**, 267).

3) Über stickstoffbindende Bakt. aus d. Ostsee (Ber. d. D. Botan. Ges. 1903, **21**, 333)

4) KRZEMINIEWSKI, S., Unters. über *Azotob. chrooc.* BEIJ. (Bull. Acad. sc. Cracovie 1908, 929); vgl. auch KOCH, A. u. SEYDEL, S. Versuche üb. d. Verlauf d. Stickstoffbindung durch *Azotobacter*. (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **31**, 570). — Nicht unerwähnt möchte ich KASERERS Mitteilungen lassen (Z. Kenntn. d. Mineralbedarfs v.

Mannit	1,5 %
K_2HPO_4	0,05 %

und setzt zu je 150 cc der Nährlösung 5 cc eines heiß gewonnenen, wässerigen Erdextraktes (3 g Erde) — oder z. B. auf

Glukose	1,5 %
K_2HPO_4	0,05 %

und fügt zu 150 cc Nährlösung ca. 0,1 g Na- oder Ca-Humat. Die Fähigkeit zur Pigmentbildung kommt nach OMELIANSKI und SSEWEROWA[1]) verschiedenen Rassen der A. in verschieden hohem Maße zu. Reichliche Pigmentproduktion (braun) erfolgt auf Dextrinnährböden (s. o.). Benachbarte Kolonien bilden auf den einander abgewandten Seiten stärker Pigment als auf den benachbarten[2]).

Den kosmopolitischen namentlich in Kulturboden verbreiteten *Bacillus asterosporus* kultiviert BREDEMANN auf MEYERS D-Gelatine[3])

Wasser	500 cc
Pepton (Witte)	6 g
Fleischextrakt	4 g
Kochsalz	1 g
Dextrose	5 g
Gelatine	50 g.

Das N-Bindungsvermögen des *B. asterosporus* wird, wenn es ihm bei der Kultur verloren gegangen ist, durch Bodenpassage regeneriert, d. h. er wird auf feuchtem Boden ausgesät; auf diesem bildet er Sporen und diese bleiben wochenlang auf dem austrocknenden Material. — In den Formenkreis des *B. asterosporus* gehört nach BREDEMANN auch das von WINOGRADSKY kultivierte *Clostridium Pasteurianum.*[4])

Die viel besprochenen Wurzelknöllchen der Leguminosen beherbergen stickstoffassimilierende Bakterien, die anscheinend zwei verschiedenen Arten angehören, dem *Rhizobium Beyerinckii* (Knöllchen der Lupinen und Sojabohne) und *Rh. radicicola* (Erbsen, Wicken, Bohnen, *Lotus* u. a. m.). Beide lassen sich auf künstlichen Nährböden kultivieren; das erstere wächst nur auf Agar, das andere auch auf Gelatine. BEYERINCK[5]) wäscht

---

Azot. Ber. d. D. Bot. Ges. 1910, **28**, 208), der den höchsten N-Gewinn auf folgende Weise erzielte: 2 g Aluminiumsulfat und 0,5 g Eisenchlorid werden in Wasser gelöst, mit Na_2HPO_4 gefällt und abgesaugt; mit Wasser wird die Masse (ohne Auswaschen) aufgeschwemmt, und durch Zusatz von 3 g Kaliumsilikat (in Wasser gelöst) zur Lösung gebracht; Dämpfung bei 2 Atm. und Auffüllung auf 1 l. Zu je 50 cc der Lösung kommen 50 cc mit: Dextrose 1 g, Gips 0,1 g, $MgSO_4$ 0,01 g, $MnSO_4$ 0,01 g. — Vgl. ferner KASERER, Z. Kenntn. d. Mineralstoffbedarfs v. *A.* (Zeitschr. landwirtsch. Versuchsw. Österreich 1911, **14**, 97) und KRZEMINIEWSKI, H., Der Einfl. d. Mineralbestandt. d. Nährlös. auf d. Entwickl. d. A. (Bull. Acad. sc. Cracovie 1908, 376).

1) OMELIANSKI, W. L. u. SSEWEROWA, O. P., Die Pigmentbildung in Kulturen des *A. chrooc.* (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **29**, 643).

2) KRZEMINIEWSKI a. a. O.

3) BREDEMANN, G., Unters. üb. d. Variation u. d. Stickstoffbindungsvermögen des *B. a.* A. M. usw. (Zbl. f. Bakt. II, 1908, **22**, 44).

4) WINOGRADSKY, Rech. s. l'assimil. de l'azote libre de l'atmosph. par les microbes (Arch. sc. biol., St. Petersbourg 1895, **3**, No. 4, 297); *Cl. Pasteurianum*, seine Morph. u. seine Eigenschaften als Buttersäureferment (Zbl. f. Bakt. II, 1902, **9**, 43).

5) Die Bakt. d. Papilionazeenknöllchen (Botan. Zeitg. 1888, **46**, 763).

die Knöllchen, brennt ihre Oberfläche ab und zerreibt sie. Zur Isolierung des *Rh. radicicola* dient das KOCHsche Plattenverfahren. Als Nährboden empfiehlt sich nach BEYERINCK ein Absud von Papilionazeenblättern, Erbsenstengeln oder Fabastengeln, dem 7 % Gelatine zugesetzt werden. Außerdem kann man $^1/_4$ % Asparagin und $^1/_2$ % Rohrzucker zugeben, ersteres ist besonders bei Kultur auf Agar vorteilhaft. Schwach saure Reaktion (ca. 0,6 ccm normale Apfelsäure auf 100 ccm Nährlösung) ist erforderlich. LÖHNIS arbeitet mit Bodenextraktagar, der 0,05 % $K_2 H P O_4$ und 1 % Mannit enthält.[1]) Weitere Mitteilungen über Kultur und geeignete Nährböden bei MAZÉ[2]) u. a.

Über die künstliche Erzeugung von Bakteroiden in den Kulturen der Leguminosen äußern sich besonders ausführlich HILTNER und STÖRMER; Zusatz von Traubenzucker (1 %) oder anderen Zuckerarten, Bernsteinsäure und verschiedenen anderen organischen Säuren usw. (siehe auch NEUMANN a. a. O.) führen zur Bakteroidenbildung. Dabei reagieren die Bakterien aus den Knöllchen verschiedener Leguminosen auf Zugabe verschiedener Zuckerarten nicht völlig gleich: Bakterien aus *Robinia* sind besonders Rohrzucker gegenüber empfindlich, die der Sojabohne gegenüber Lävulose.[3])

Nitrifikationsbakterien. — Die Nitrifikationsmikroben, welche einerseits Ammoniak in Nitrit (Nitritbildner *Nitrosococcus* und *Nitrosomonas*), andrerseits Nitrit in Nitrat (Nitratbakterien *Bacillus nitrobacter*) oxydieren,[4]) sind im Boden weit verbreitet. Ihr Stoffwechsel kennzeichnet sie als besondere Gruppe: sie verarbeiten die Kohlensäure der Luft als C-Quelle, schöpfen N aus Ammoniak bezw. Nitriten und bedürfen außerdem nur noch der Mineralsalze zu ihrer Ernährung. Organische Verbindungen (Kohlehydrate, Albuminosen, Amidokörper usw.) sind nicht nur überflüssig, sondern im allgemeinen sogar schädlich; auf die Nitritbakterien wirkt bereits 0,1 Dextrose schädigend (WINOGRADSKY und OMELIANSKI); auf die Nitratbildner wirkt auch Ammoniak wie Gift.[5]) Daraus ergeben sich wichtige Schlüsse für die Kulturmethoden, die von WINOGRADSKY und OMELIANSKI bestens ausgearbeitet worden sind.[6])

Den Nitritbildner gewinnt man, indem man eine Lösung folgender Zusammensetzung mit einer Bodenprobe infiziert:

---

1) LÖHNIS, Landwirtsch.-bakt. Prakt. 1911.

2) MAZÉ, Fixation de l'azote libre par le bacille des nodosités des Légumineuses (Ann. Inst. Pasteur 1897, **11**, 44); weiße Bohnen werden ½ Stunde lang gekocht, aber so, daß die einzelnen Samen nicht platzen und das Stärkemehl nicht in den Dekokt kommt. Dieses enthält 5 ‰ N; zugefügt werden ca. 2 % Saccharose, 1 ‰ NaCl, Spuren doppeltkohlensaures Natrium. S. auch MAZÉ, Les microbes des nodosités des lég. (ibid. 1898. **12**, 1); DE RÓSSI, G., Üb. d. Mikroorganismen, welche die Wurzelknöllchen d. Legum. erzeugen (Zbl. f. Bakt. II, 1907, **18**, 289); ZIPFEL, H., Beitr. z. Morph. u. Biol. d. Knöllchenbakt. d. Leg. (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **32**, 97; 2 % Sanatogen oder dergl., 1 % Glukose mit Apfelsäure angesäuert).

3) HILTNER u. STÖRMER, Neue Unters. üb. d. Wurzelknöllchen d. Leguminosen u. deren Erreger (Arb. biolog. Abteil. d. K. Gesundheitsamtes 1903, **3**, 151).

4) Näheres über die Organismen z. B. bei WINOGRADSKY, S., Contributions à la morphologie des organismes de la nitrification (Arch. sc. biol. 1892, **1**).

5) Vgl. z. B. WINOGRADSKY, S. u. OMELIANSKI, V., Über den Einfluß der organischen Substanzen auf die Arbeit der nitrifizierenden Mikroben (Zbl. f. Bakt. II, 1899, **5**, 132).

6) Vgl. besonders OMELIANSKI, Über die Isolierung der Nitrifikationsmikroben aus dem Erdboden (ibid. 537).

Destill. Wasser	1000	g
Ammon. sulf.	2	„
Natr. chlor.	2	„
Kal. phosph.	1	„
Magn. sulf.	0,5	„
Ferr. sulf.	0,4	„

und wiederholt in gleiche Lösungen überimpft. Zu je 50 ccm der Lösung werden ca. 0,5 g Magnesiumkarbonat zugesetzt. Um die Bakterien zu lebhafter Entwicklung anzuregen, kann man, sobald die Lösungen keine Ammoniakreaktion mehr geben, zu je 50 ccm Nährlösung noch 1 ccm 10 %iger Ammoniumsulfatlösung zusetzen. Die 3. oder 4. Umsaat ist gewöhnlich so rein, daß man sie als Ausgangsmaterial zu einer Reinkultur benutzen kann.

Winogradsky führte die Methode der Kieselsäuregallertkulturen ein[1]; über die Herstellung des Sols s. o. S. 31. Winogradsky und Omelianski halten sich folgende Lösungen vorrätig:

1. Kal. phosphor. . . . . . 1 g
   Ammon. sulf. . . . . . . 3 „
   Magnes. sulf. . . . . . . 0,5 „
   Destill. Wasser . . . . . 1000 „
2. Ferrum sulf. . . . . . 2 %
3. Gesättigte Kochsalzlösung,
4. „Magnesiamilch", d. h. Aufschwemmung von allerfeinster kohlensaurer Magnesia in Wasser.

Zu 50 ccm des Sols kommen 2,5 ccm der ersten und 1 ccm der zweiten Lösung. Von der NaCl-Lösung kommt auf jede zu gießende Platte oder in jedes Reagensglas eine Platinöse oder ein kleiner Tropfen, von der Magnesiamilch so viel, daß die Gallerte ein milchiges Aussehen annimmt. Die Magnesia kann man durch 0,1 %ige Sodalösung ersetzen, doch scheinen dann die Nitritbildner schlechter zu wachsen. Entweder setzt man nun bei der Impfung eine Öse aus der Kultur dem Kieselsäuresol zu und gießt die Flüssigkeit in die Petrischale aus — oder man trägt einen bakterienhaltigen Tropfen auf die erstarrte Platte auf; benutzt man zum Verteilen einen stumpf gebogenen Glasstab, so wird ein Aufreißen der Gallerte verhindert.

Durch folgendes Verfahren gelingt es nach Omelianski, sehr stattliche Kolonien heranzuzüchten. Man schneidet an zwei gegenüberliegenden Stellen des Schaleninhalts zwei kleine Segmente heraus und füllt die Löcher wiederholt mit (immer 2 Tropfen) 10 % Ammoniumsulfatlösung; die von der Magnesiamilch getrübte Masse wird dabei klar. Die makroskopisch sichtbaren Kolonien erleichtern dann das Überimpfen; wiederholte Überimpfung ist durchaus erforderlich, wenn man zu völlig reinen Kulturen gelangen will. — Die Nitritbildner lassen sich auch in Reagensgläsern (auf schräg erstarrter Oberfläche) kultivieren.

Die Anfertigung der Kieselsäureplatten ist zwar umständlich, aber diese lassen sich durch andere gallertige Nährböden, etwa Agar, nur unvollkommen ersetzen, weil dieser offenbar selbst in besonders gereinigtem Zustande (s. o. S. 37) noch zu viel organische

---

1) Winogradsky, S., Rech. s. l. organism. de la nitrific. IV u. V. (Ann. Inst. Pasteur 1891, 5, 92, 577).

Nährstoffe enthält. BEYERINCK,[1]) der über die Kultur der Nitrifikationsbakterien auf Agar berichtet, gibt auch eine besondere Salzlösung an, die OMELIANSKI (a. a. O.) für wenig vorteilhaft hält. Jedenfalls ist das Wachstum der Bakterien auf Kieselgallerte sehr viel besser als auf Agarplatten.

Vorzüglich hingegen wachsen die Nitritbakterien auf OMELIANSKIS Magnesiagipsplatten.[2]) Aus Gips und kohlensaurer Magnesia (99 : 1) rührt OMELIANSKI mit Wasser eine teigige Masse an, die vor dem Festwerden in Streifen und Kreisplatten — für Reagensgläser und Petrischalen — zerlegt wird. Mit Nährlösung (s. o. erstes Rezept) werden die Gipsplatten sterilisiert und geimpft. Damit die Impffläche ganz glatt ausfällt, gieße man den Gips auf eine Spiegelscheibe aus. Derselbe Forscher benutzte außerdem dicke Papierscheiben[3]) — also einen vorzugsweise aus Zellulose bestehenden Nährboden — zur Kultur der Nitritbildner: dicke Paketchen von Filtrierpapier werden zusammengenäht und in Petrischalen mit der üblichen Nährlösung benetzt; kleine Kolonien werden 10—15 Tage nach der Impfung sichtbar. Die Flüssigkeit soll in der Schale bis zu halber Höhe des Papierpäckchens stehen; ist alles Ammoniak in ihr geschwunden, so setzt man einige Tropfen Ammoniumsulfatlösung (10 %) zu.

Reine Magnesiaplatten fertigte sich PEROTTI an.[4])

MAKRINOFF schließlich versuchte, Nährboden mit geringem Gehalt an organischen Substanzen zu verwenden und teilt mit, daß das Wachstum der Nitritbildner durch diese wesentlich gefördert werde. Folgende Lösung wurde hergestellt:[5])

NaCl	2 g
K_2HPO_4	1 „
$MgSO_4$	0,5 „
$FeSO_4$	0,4 „
trockene Blätter	2,0 „
(oder trockener Boden	160—250 g)
Dest. Wasser	1000 cc.

Mit dieser Lösung werden

Gips	300 g
$MgCO_3$	30 „
$MgNH_4PO_4$	3 „

durchmischt und aus dem Brei Platten gegossen. Nach MAKRINOFF üben die organischen Substanzen seiner Materialien, in flüssigen Medien angewandt, hemmenden Einfluß aus, auf festem Substrat wirken sie fördernd.

Die von WINOGRADSKY stammende Methode der „negativen Platten" (s. o. S. 61) lieferte bei der Isolierung der Nitritbakterien keine befriedigenden Resultate.[6]) —

1) Kulturvers. m. Amöben auf fest. Substr. (Zbl. f. Bakt. 1896, **19**, 257/58).

2) Magnesiagipsplatten als neues festes Substrat für die Kultur der Nitrifikationsorganismen (Zbl. f. Bakt. II, 1899, **5**, 652).

3) Kleinere Mitteilungen über Nitrifikationsmikroben, I. Die Kultur des Nitritbildners auf Papierscheiben (ibid. 1902, **8**, 785).

4) PEROTTI, R., Di una modif. al metodo d'isolamento dei microorg. della nitrificazione (Atti R. Accad. Lincei 1905, **14**, 228).

5) MAKRINOFF, J., Magnesia-Gipsplatten u. Magnesiaplatten mit org. Subst. usw. (Zbl. f. Bakt. II, 1909, **24**, 415).

6) Hierüber wie über FRANKLANDS Verdünnungsmethode siehe OMELIANSKI a. a. O.

Die Nitratbakterien sind leichter zu erhalten. Zuerst muß man auch für sie eine Reihe Überimpfungen ausführen in folgender Lösung:

Destill. Wasser	1000	g
Natr. nitros. (MERCK)	1	„
Natr. carbon. (ustum)	1	„
Kal. phosphor.	0,5	„
Natr. chlor.	0,5	„
Ferrum sulf.	0,4	„
Magnes. sulf.	0,3	„[1])

Die Kultur auf Kieselgallerte gibt gute Resultate, es genügt aber folgender von WINOGRADSKY[2]) empfohlener Nähragar:

Leitungswasser	1000	g
Agar	15	„
Natr. nitros.	2	„
Natr. carbon. (ustum)	1	„
Kal. phosph.	Spuren.	

Sobald die Reaktion auf salpetrige Säure nicht mehr eintritt, kann man Natriumnitrit zusetzen, die Kolonien wachsen dann stattlich heran.

Beim Wachstum im Boden sind die nitratbildenden gegen gelöste organische Substanzen erheblich weniger empfindlich als in Flüssigkeiten; vielmehr kann organische Nahrung, wie die Humusstoffe, in Sand oder Boden ihre Entwicklung sogar fördern.[3])

Über die in Gesellschaft der Nitratbakterien regelmäßig auftretenden Mikroben vgl. BERSTEYN.[4])

Denitrifikationsbakterien. — Daß Nitrate von Mikroben reduziert werden, ist eine verbreitete Erscheinung; das Produkt kann dabei sehr verschieden ausfallen: viele Bakterien liefern Nitrite, selten (*Azotobacter* nach BEYERINCK und VAN DELDEN) entstehen Ammoniumverbindungen; unter Denitrifikation versteht man die Reduktion von Nitraten mit Bildung freien Stickstoffs. Denitrifizierende Bakterien sind in Mist, auf Pflanzenteilen, im Meerwasser usw. anscheinend allgemein verbreitet. Am einfachsten ist es, sie aus Boden zu gewinnen.

Geeignete C-Quellen sind nach BEYERINCK[5]) Bouillon, die Salze der organischen Säuren (K, Na, NH_3; Zitronen-, Wein-, Apfelsäure); mit 5 % Kalium-Natriumtartrat und 2 % KNO_3 erhielt BEYERINCK sehr formenreiche Denitrifikatorenflora, darunter *Bac.*

---

1) WINOGRADSKY, S., Über den Einfluß der organischen Substanzen auf die Arbeit der nitrifizierenden Mikrobien (Zbl. f. Bakt. II, 1899, **5**, 329, 333).

2) Z. Mikrobiol. d. Nitrifikationsprozesses (Zbl. f. Bakt. II, 1896, **2**, 415).

3) BAZAREWSKI, Beitr. z. Kenntn. d. Nitrifikation u. Denitr. im Boden. Göttingen, Dissertation, 1906. COLEMAN, Unters. üb. Nitrifikation (Zbl. f. Bakt. II, 1908, **20**, 401).

4) Üb. einige in d. Kult. z. Reinzüchtung d. Nitratbildner regelmäßig auftretende Bakterienarten (Arb. bakt. Inst. techn. Hochsch. Karlsruhe **3**, H. 1).

5) BEYERINCK, M. W. u. MINKMAN, D. C. J., Bildung u. Verbrauch v. Stickoxydul durch Bakt. (ibid. II, 1910, **25**, 30); vgl. auch ITERSON, Anhäufungsversuche mit dinitrifiz. Bakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **12**, 106).

pyocyaneus, dessen Anreicherung auch durch Harnsäure und Asparagin gelingt, sowie nach Gartenerdeaussaat auf

Leitungswasser	100	Teile
Äthylalkohol	0,5	„
KNO_3	1	„
K_2HPO_4	0,05	„

bei 37° und bei Luftabschluß.

Weiterhin erwähnt BEYERINCK seine Kulturen bodenbewohnender Denitrifikatoren in

Mannit	2 %	(oder Glyzerin)
KNO_3	1 %	
K_2HPO_4	0,05 %	— bei 37°

und mehrere andere Rezepte.

ITERSON[1]) beobachtete ferner, daß die denitrifizierenden Bakterien sich gut mit Zellulose (Filtrierpapier) ernähren lassen:

Leitungswasser	100	Teile
Papier	2	„
KNO_3	0,25	„
K_2HPO_4	0,05	„ ;

geimpft wird mit einigen ccm Kanalwasser und Moder; Optimum der Entwicklung bei 35° (etwa binnen 12 Tagen). — Die GILTAYsche Nährlösung[2]) schließlich enthält:

1000	g	Wasser,
2	„	Kali- oder Natronsalpeter,
5	„	Zitronensäure,
2	„	Magnesiumsulfat,
2	„	Monokaliumphosphat,
0,2	„	Chlorkalzium,
Spur		Eisenchlorid.

Über denitrifizierende Bakterien des Meeres gibt z. B. BAUR[3]) einige Daten. 1 kg frisch gesammelte (daher noch glykogenhaltige) Miesmuscheln werden in 1—2 l Seewasser gekocht und der filtrierten Flüssigkeit 2 % Pepton und 0,25 % Kalziumnitrit zugesetzt. Dieses ist dem Kaliumnitrit vorzuziehen, weil bei Verwendung des letzteren durch das entstehende Kaliumkarbonat die Flüssigkeit stark alkalisch wird. Nach Infektion mit Wasser- oder Schlickproben gibt sich die Gegenwart denitrifizierender Mikroben durch Schaumbildung zu erkennen. Aus der Muschelbouillon kann man Gelatine und Agar — die erstere ist zu neutralisieren — herstellen. Die Kolonien denitrifizierender Bakterien umgeben sich mit einem Hof von Kalziumkarbonat und mit feinen Gasbläschen.

In der freien Natur verhalten sich übrigens die denitrifizierenden Mikroben offenbar ganz anders als auf den üblichen Nährmedien. Während sie bei Kultur in Flüssigkeiten fast den gesamten disponiblen N frei werden lassen, verwenden sie ihn im Boden — falls dieser nicht zu naß ist — fast ausschließlich zur Eiweißsynthese.[4])

1) ITERSON, Zersetzg. v. Zellulose durch aërobe Mikroorganismen (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **11**, 689).

2) GILTAY u. ABERSON, Rech. s. un mode de dénitrif. (Arch. néerl. sc. nat. 1892, **25**.)

3) Über zwei denitrifizierende Bakterien aus der Ostsee (Wissenschaftl. Meeresunters. N. F. Kiel 1902, **6**, 9). — Daselbst sind auch noch weitere Nährböden angegeben.

4) KOCH, A., u. PETTIT, H., Üb. d. verschied. Verlauf d. Denitrifikation im Boden u. in Flüssigkeiten (Zbl. f. Bakt. II, 1910, **26**, 335).

Sulfatreduzierende Bakterien. — Bakterien, welche schwefelsaure und schwefligsaure Salze reduzieren und Schwefelwasserstoff frei werden lassen (Desulfuration), finden sich im Schlamm süßer und mariner Gewässer, auch in sulfathaltigen Mineralwässern. v. DELDEN isoliert solche durch Überimpfen von Schlamm in folgender Lösung:

Leitungswasser	100 g
K_2HPO_4	0,05 „
Natriumlaktat	0,5 „
Asparagin	0,1 „
Gips oder $MgSO_4 + 7\,H_2O$	0,1 „
Ferrosulfat	Spur

und beschreibt die Methoden der Reinkultur.[1])

Harnstoffbakterien können aus der Laboratoriumsluft leicht aufgefangen werden. Man kultiviert sie aërob auf den üblichen Nährböden, z. B. auf Peptongelatine, der man nach MIQUEL[2]) 2—5 % Harnstoff zugefügt hat. BEYERINCK[3]) nimmt

1000	g	Leitungswasser,
50	„	Harnstoff,
10	„	Natriumazetat,
0,25	„	KH_2PO_4.

Durch die Tätigkeit der Bakterien wird Harnstoff in Kohlensäure und Ammoniak zersetzt; dabei fallen in der Nähe der Harnstoffbakterienkolonien eine Menge Kristalle (Kalziumkarbonat und -phosphat) aus. BEYERINCK kultiviert die Bakterien ferner auf einer Gelatine, die mit einem Dekokt von Preßhefe (20 g in 100 ccm Wasser) und 2—3 % Harnstoff hergestellt ist. Wo sich harnstoffspaltende Mikroben entwickeln, entsteht an der Oberfläche des Nährsubstrats ein irisierendes Häutchen aus amorphem Niederschlag von Kalziumphosphat[4]) (NEWTONS Farbenringe, „Iriserscheinung").

Schwefelbakterien. — Bakterien, welche H_2S zu Schwefel und diesen zu H_2SO_4 oder doch wenigstens Thiosulfate zu Tetrathionsäure und Schwefelsäure oxydieren können, finden sich wohl in allen natürlichen Gewässern, die H_2S enthalten, und lassen sich aus diesen leicht gewinnen. Die Bildung dieses Gases fördert man, indem man der Wasserprobe gleichzeitig mit dem bakterienhaltigen Schlamm etwas Kalziumsulfat zusetzt. Sobald durch die Wirkung reduzierender Organismen des Schlammes die Bildung von H_2S aus Gips vor sich geht, entwickeln sich binnen wenigen Wochen die Schwefelbakterien — die beweglichen Beggiatoaformen, die festsitzenden *Thiotrix* und Purpurbakterien (s. u.) — zu üppigen Vegetationen. Über die Lebensbedingungen der ersten Formengruppen ist noch nicht viel bekannt, da es noch nicht gelungen ist, sie auf künstlichen Medien rein zu züchten. Zu beachten ist, daß die oxydierenden S-Bakterien natürlich ausgesprochenes Sauerstoffbedürfnis haben, und daß sie höchstwahrscheinlich organische Nahrung verschmähen. Reines Beggiatoamaterial ist wohl nur in Schwefelquellen anzutreffen. WINOGRADSKY beschreibt eine Einrichtung, mit welcher es gelingt, durch ständigen Wasser-

1) BEYERINCK, Üb. *Spirillum desulfuricans* als Ursache v. Sulfatreduktionen (Zbl. f. Bakt. II, 1895, **1**, 1, 1900, **6**, 648); VAN DELDEN, Beitr. z. Kenntn. d. Sulfatreduktion durch Bakt. (ibid. II, 1903, **11**, 81, 113).

2) LAFARS Handb. d. techn. Mykol. 1904, **3**, 71.

3) Anhäufungsversuche mit Ureumbakt. (Zbl. f. Bakt. II, 1901, **7**, 45).

4) Vgl. SÖHNGEN, N. L., Ureumspaltung bei Nichtvorhandensein v. Eiweiß (Zbl. f. Bakt. II, 1909, **23**, 91).

zufluß zur Bakterienkultur und Durchleitung von Schwefelwasserstoff eine Art „künstliche Schwefelquelle" zu konstruieren, in der sich die Beggiatoen gut halten.[1]) — Eine besondere Gruppe von Schwefelbakterien wurde in neuerer Zeit von NATHANSOHN[2]) und BEYERINCK[3]) näher erforscht. Es handelt sich bei dieser um Bakterien, die im Meeresschlamm (Neapel, holländische Küste) offenbar weit verbreitet vorkommen, und welche Thiosulfate oxydieren können. NATHANSOHN kultivierte sie in einer 0,1—1 %igen Lösung von Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$) in Meereswasser, sowie in folgender Lösung:

3 % NaCl,
0,25 % $MgCl_2$,
0,1 % KNO_3,
0,5 % Na_2HPO_4

nebst Zusatz von Magnesiumkarbonat. Die Bakterien wachsen auf Agar; sie bedürfen zu ihrer Entwicklung der CO_2 der Luft oder Karbonate; organische C-Verbindungen können sie offenbar nicht ausnutzen. — BEYERINCK erhielt ähnliche Bakterien in reichlicher Menge, wenn er folgende Mischung:

0,5 % $Na_2S_2O_3 + 5\,H_2O$,
0,1 % $NaHCO_3$,
0,02 % K_2HPO_4,
0,01 % NH_4Cl,
0,01 % $MgCl_2$

mit Grabenwasser oder Schlamm impfte. — Vgl. ferner den nächsten Abschnitt.

Purpurbakterien. — Wie MOLISCH[4]) gezeigt hat, sind südwasserbewohnende wie marine Purpurbakterien leicht zu erhalten, wenn man Fluß- oder Meerwasser mit organischen Stoffen versieht, wie Heu, gekochten Hühnereiern, frischen Rinderknochen, Schnecken, Regenwürmern oder faulendem Seegras, toten Seesternen, Muscheln, Seefischen usw. Die Purpurbakterien entwickeln sich nicht sonderlich schnell, lieben kräftige Belichtung und haben nur geringes Sauerstoffbedürfnis; viele bedürfen des freien Sauerstoffs vielleicht überhaupt nicht. Hieraus wird verständlich, warum die Purpurbakterien in ausgegossenen Platten nicht wachsen. Hat man eine an Purpurbakterien reiche Rohkultur gewonnen, so impft man von der roten Flüssigkeit in flüssigen Agar oder Gelatine (Reagensgläser) von folgender Zusammensetzung:

1000 g Wasser,
0,5 „ $MgSO_4$,
0,5 „ K_2HPO_4,
10 „ Pepton,
18 „ Agar,
Spur $FeSO_4$

1) Nähere Angaben bei WINOGRADSKY, S., Über Schwefelbakterien (Botan. Zeitg. 1887, **45**, 493, besonders 537). Von demselben Autor: Beitr. z. Morph. und Physiol. der Bakterien (1888, Heft 1). Über Rohkulturen auch MOLISCH, Zwei neue Purpurbakterien mit Schwebekörperchen (Botan. Zeitg. 1906, **64**, 223) und Neue farblose Schwefelbakt. (Zbl. f. Bakt. II 1912, **33**, 55).

2) Eine neue Gruppe von Schwefelbakterien (Mitt. zool. Stat. Neapel 1902, **15**, 655).

3) Üb. d. Bakt., welche sich im Dunkeln mit Kohlens. als Kohlenstoffquelle ernähren können (Zbl. f. Bakt. II, 1904, **11**, 593).

4) Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen, Jena 1907.

oder besser noch in	1000 g	Flußwasser,
	18 „	Agar,
	(oder 100 „	Gelatine),
	5 „	Pepton,
	5 „	Dextrin oder Glyzerin.

Man schüttelt die Kulturen gut durch, impft event. zur Verdünnung in andere Gläschen über und überläßt sie an sehr hellen Plätzen des Laboratoriums der weiteren Entwicklung. Nachdem Kulturen in der Gallerte sichtbar geworden sind, zertrümmert man die Gläschen zum Freilegen und Überimpfen der roten Kolonien. Außerdem kultiviert MOLISCH die Purpurbakterien auf Objektträgern, indem er aus einem Pepton-Dextrin-Agarröhrchen nach gehöriger Verdünnung des Bakterienmaterials 1—3 Tropfen auf einen sterilisierten Objektträger ausgießt, sie mit einem sterilisierten großen Deckglas (3 : 4 cm) bedeckt und das Präparat mit Terpentinharz verschließt.

Eisenbakterien sind solche, welche in ihren Membranen Eisenoxydhydrat speichern. Letzteres gewinnen sie wahrscheinlich durch Oxydation des Eisenoxyduls. Aërob. Verschiedenartige Eisenbakterien, darunter die weit verbreitete *Leptothrix ochracea*, lassen sich nach WINOGRADSKY[1]) leicht vorrätig halten und reichlich vermehren, wenn man auf Pflanzenteile, die in Zersetzung begriffen sind — etwa ausgekochtes Heu, alte Baumblätter usw., — Brunnenwasser aufgießt und etwas (frisch gefälltes) Eisenoxydhydrat zusetzt. Nach 8—10 Tagen bilden sich umfangreiche Flocken und Rasen verschiedener Eisenbakterien.

BÜSGEN[2]) kultivierte *Cladothrix dichotoma*, indem er Büschel von Bakterienmaterial in sehr verdünnte Fleischextraktlösung übertrug; auch Reinkulturen auf Fleischextraktgelatine gelangen ihm. HÖFLICH[3]) nahm zu demselben Zweck

Wasser	1000	cc
Fleischextrakt	0,5	g
Gelatine	45	„

Die Reinkultur von *Leptothrix* (*Chlamydothrix*) *ochracea* erreichte MOLISCH[4]) in der Weise, daß er zu Leitungswasser (Moldau bei Prag) 0,05 % Manganpepton zufügte; dieses (MERCK, DE HAËN-Seelze bei Hannover) enthält außer 4 % Mn Pepton, Zucker und etwas Alkalien; 3—4 Tage nach der Impfung zeigen sich (im dunkeln wie bei diffusem Licht) braune Flöckchen aus *L. ochracea*, *Anthophysa*, *Cladothrix* u. a. Impft man mit verunreinigtem *Leptothrix*material 2% Peptonlösung, so entstehen nach 1—3 Tagen zahlreiche Schwärmer, die man auf

Leitungswasser	1000	g
Manganpepton	0,5	„
Agar	10	„

aussäen kann. Auf diesem Wege gelangte MOLISCH zu Reinkulturen. Steht kein geeignetes Leitungswasser zur Verfügung, so bedient man sich nach MOLISCH einer Abkochung von Torf (in destill. H_2O); hierzu pro l 0,25 g Manganpepton und 100 g Gelatine. Temperaturoptimum 23—25° C.

1) Über Eisenbakterien (Botan. Zeitg. 1888, **46**, 261); daselbst Hinweise auf die ältere Literatur.

2) BÜSGEN, M., Kulturversuche mit *Cladothrix dichotoma* (Ber. d. D. Bot. Ges. 1894, **12**, 147).

3) HÖFLICH, K., Kultur u. Entwicklungsgesch. der *Cl. dich.* COHN (Österr. Monatsschrift f. Tierheilkunde 1901, **25**, 4).

4) MOLISCH, H., Die Eisenbakterien. Jena 1910. 28ff. Dort zahlreiche weitere Literaturangaben.

Im Gegensatz zu *Cladothrix* und *Crenothrix* beansprucht *Spirophyllum ferrugineum* nach LIESKE[1]) unbedingt eisenhaltige Nährlösungen. LIESKE füllt Erlenmeyer-Kolben etwa 2 cm hoch mit

H_2O destill.	1000 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,5 „
KCl	0,05 „
$MgSO_4$	0,05 „
K_2HPO_4	0,05 „
$Ca(NO_3)_2$	0,01 „

Die Kolben werden sterilisiert, bleiben mindestens 3 Tage an der atmosphärischen Luft stehen, damit die Lösung genügende Mengen O und CO_2 aufnehmen kann; dann gibt man im sterilen Raum zu jeder Kultur ca. 0,05 g grober Eisenfeilspäne, die separat sterilisiert worden sind (1 Stunde ca. 160°). Dann wird mit Roh- oder Reinkulturmaterial geimpft. Aufenthalt der Kulturen in einer Atmosphäre mit 1 % CO_2 ist vorteilhaft. Temperaturoptimum 6°. Licht entbehrlich. Aërob. Organische Ernährung wirkt wachstumhemmend.

Methanbakterien. — Sie vermögen CH_4 zu oxydieren und mit ihm als einziger C-Quelle auszukommen. Um den *Bacillus methanicus* zu gewinnen, impft SÖHNGEN[2]) eine rein mineralische Nährlösung

Wasser	100 g
$CaSO_4$	0,01 „
NH_4Cl	0,10 „
$MgNH_4PO_4$	0,05 „
K_2HPO_4	0,05 „

mit Kanalwasser, Kloakenschlamm oder dergl. und läßt über der Nährlösung ein Gemisch von $^1/_3$ Methan und $^2/_3$ gewöhnlicher Atmosphäre bei 30° stehen. Von der Rohkultur kommt man nach Aussaaten auf Agar zu Reinkulturen.

Wasserstoffbakterien. — Impft man eine mineralische Nährlösung — z. B. nach KASERERS Rezept[3])

$NaHCO_3$	0,1 %
KH_2PO_4	0,05 %
NH_4Cl	0,1 %
$MgSO_4$	0,02 %
$FeCl_3$	0,00001 % —

mit Erde und läßt über der Lösung Knallgas stehen, so entwickeln sich in der Kultur Bakterien, welche H und O zu H_2O zu kondensieren imstande sind. Wasserstoffbakterien sind von verschiedenen Autoren beobachtet worden, doch gehen die Meinungen über die Zusammensetzung dieser Flora noch weit auseinander.[4])

1) LIESKE, R., Beitr. z. Kenntn. d. Phys. v. *Spir. ferr.*, einem typischen Eisenbakterium (Jahrb. f. wiss. Bot. 1911, **49**, 91).

2) SÖHNGEN 1906 a. a. O.; s. auch GIGLIOLI, J. u. MASONI, G., Nuove osservazioni sull' assorbimento biologico del metano etc. (Staz. sperim. agr. 1909, **42**, 589).

3) Vgl. KASERER, Üb. d. Oxyd. des H und des CH_4 durch Mikroorganismen (Zeitschr. landwirtsch. Versuchswesen Österreich 1905, **8**, 789), Oyxd. des H durch Mikroorg. (Zbl. f. Bakt. II, 1906, **16**, 681).

4) Vgl. namentlich auch NIKLEWSKI, M., Beitr. z. Kenntn. d. H-Oxyd. Mikroorg. (Bull. Acad. Sc. Cracovie, 1906, 911), Üb. d. H-Oxyd. durch Mikroorg. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1910, **48**, 113) und LEBEDEFF, A. J., Üb. d. Assim. des C bei H-Oxyd. Bakt. (Ber. d. D. Bot. Ges. 1909, **27**, 598).

Leuchtbakterien. — *Bacterium phosphoreum*, welches das Leuchten des Schlachtviehfleisches und toter Seefische hervorruft, ist namentlich von letzteren leicht zu gewinnen.[1]) Schlachtviehfleisch bringt MOLISCH dadurch zum Leuchten, daß er ein Stück davon bis etwa zur halben Höhe mit 3 % Kochsalzlösung übergießt und unter einer Glasglocke bei 9—12° C. stehen läßt; nach 1—3 Tagen tritt Leuchten ein. Als künstliches Nährsubstrat benutzt man mit BEYERINCK Seefischdekokt + 0,5 % Asparagin, 1 % Glyzerin, 1 % Pepton und 8 % Gelatine oder mit MOLISCH Fleischsaftgelatine, welche 10 % Gelatine, 1 % Pepton, 3 % NaCl und event. noch 0,5 % Glyzerin enthält. Der Zusatz des Chlornatriums ist seiner osmotischen Wirkung wegen wichtig; nach MOLISCH rufen auch Kalisalpeter und Chlorkalium starkes Leuchten hervor. Erhebliche Steigerung zeigt das Leuchten unter dem Einfluß von Schimmelpilzen (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*).[2]) — Die einheimischen Leuchtbakterien sind an niedere Temperaturen angepaßt, *B. phosphoreum* geht schon bei 30° zugrunde. — Über die Empfindlichkeit der Leuchtbakterien gegenüber Sauerstoff, dessen Gegenwart für die Lichtproduktion unerläßlich ist, hat besonders BEYERINCK Versuche angestellt.

Zellulosezerstörende Organismen. — Die Organismen der Zellulosegärung studierte zuerst OMELIANSKI[3]). Sie lassen sich z. B. aus Pferdemist und Schlamm jederzeit leicht gewinnen und anaërob in folgender Lösung kultivieren:

Destill. Wasser	1000 g
Kaliphosph.	1 „
Magn. sulf.	0,5 „
Ammon. sulf. (oder Ammon. phosph.)	1 „
Natr. chlor.	Spuren.

Die Zellulose wird in Form von Filtrierpapierstreifehen zugesetzt. Die der Gärung der Zellulose vorausgehende Inkubationszeit beträgt nie weniger als eine Woche und zuweilen mehr als einen Monat. Die Papierstreifen werden zunächst welk und fleckig und zerfallen allmählich. Von aërob lebenden Zellulosezerstörern war oben S. 193 (ITERSON) die Rede.

Zwei aërobe, auf Filtrierpapier kultivierbare Zellulosezerstörer isolierte MERKER von *Elodea* (*Micrococcus cytophagus* und *M. melanocyclus*, der letztere bildet auf Filtrierpapier schwarze konzentrische Ringe.)[4])

Pektinzerstörende Organismen. — WINOGRADSKY[5]) kultivierte sie auf sterilisierten Flachsstengeln, die mit nicht sterilisierten infiziert wurden. Reinkultur auf Kartoffeln,

---

1) Über diesen und die nachfolgend erwähnten Punkte vgl. besonders MOLISCH, H., Leuchtende Pflanzen, 2. Aufl. Jena 1912, und Photogene Bakterien in LAFARS Handb. d. techn. Mykol. 1907, **1**, 623; daselbst weitere Literaturzitate. Von anderen Autoren besonders hervorzuheben BEYERINCK, Photobacteria as a reactive in the investigation of the chlorophyll function (Kon. Akad. van Wetensch., Amsterdam 1901).

2) FRIEDBERGER, E. u. DOEPNER, H., Üb. d. Einfl. v. Schimmelpilzen auf d. Lichtintens. in Leuchtbakterienkult. (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1906, **43**, 1); über Fortdauer des Leuchtens in Mischkulturen vgl. NADSON, Z. Phys. d. Leuchtbakt. (Bull. jard. bot. St. Petersb., 1908, **8**, 144).

3) Über die Gärung der Zellulose (Zbl. f. Bakt. II, 1902, **8**, 193).

4) MERKER, E., Parasitische Bakterien auf Blättern v. *Elodea* (Zbl. f. Bakt. II, 1911, **31**, 578).

5) Sur le rouissage du lin et son agent microbien (C.R. Acad. Sc. Paris 1895, **121**, 742).

auf peptonhaltigen Zuckerlösungen, Dekokten von Flachs, Rüben usw., welch letzteren die Organismen ihren Pektingehalt entziehen.

Chitinspaltende Bakterien. — Benecke[1]) gewinnt reines Chitin aus den Panzern der Nordseekrabbe (*Crangon vulgaris*), die kurze Zeit mit kalter verdünnter Salzsäure, ca. 1 Tag mit 20 %iger Natronlauge, dann mit heißem Wasser, Alkohol und Äther behandelt werden. Um fein verteiltes Chitin zu gewinnen, löst man es in bei 0° gesättigter HCl und fällt es mit Wasser aus. Die elektiven Rohkulturen, von welchen Benecke ausging, wurden mit 0,03 % Dikaliumphosphat und 0,03 % Magnesiumsulfat in 1,5 %iger NaCl-Lösung auf ungefälltem Chitin angesetzt und mit einer Öse Plankton geimpft. Die Reinkulturen enthielten in 1½ % Gelose (s. o. S. 38) dieselben Salze und außerdem pulverförmiges Chitin. Den von ihm isolierten chitinzerstörenden Spaltpilz nennt Benecke *Bacillus chitinovorus*.

Pathogene Bakterien. — Bei der großen praktischen Bedeutung der pathogenen Bakterien haben diese seit vielen Jahren das Interesse der Bakteriologen ganz besonders in Anspruch genommen. Von den vielen Methoden, die für ihre Kultur in Anwendung kommen, und der Literatur, die sich mit ihnen befaßt, soll hier keine auch noch so summarische Übersicht gegeben werden, um so weniger, als gerade dieses Kapitel der Mikrobiologie fortwährend neue Bearbeitungen in der medizinischen Lehrbuchliteratur erfährt. Im folgenden will ich nur einige besonders wichtige pathogene Arten erwähnen und solche, die als geeignete Studienobjekte für physiologische u. a. Fragen sich erwiesen haben, und verweise für alle Einzelheiten auf die medizinisch-bakteriologischen Nachschlagewerke.[2])

Fast für alle Arten pathogener Bakterien sind bereits Methoden der künstlichen Züchtung gefunden worden. Im allgemeinen sind Nährgelatine, Nähragar sowie Serum gute Nährböden für die kultivierbaren pathogenen Mikroben; ihr Wachstumsoptimum liegt im allgemeinen bei Bruttemperatur (37°). Über die Kultur pathogener Bakterien in Düngerstoffen vgl. Almquist.[3])

In hygienischen Instituten werden meist zahlreiche pathogene Bakterien in künstlichen Kulturen vorrätig gehalten. Als Bezugsquelle ist ferner Krals Bakteriologisches Laboratorium in Prag zu nennen.

Milzbrand (*Bac. anthracis*) gewinnt man aus Milz, Leber oder Herz der an Milzbrand verstorbenen Tiere (Schafe, Rinder, Pferde). Die Ermittlung seiner Kulturbedingungen gehört zu den Taten R. Kochs.[4]) Milzbrand wächst auf üblicher Nährgelatine und -Agar und auf Kartoffeln in Form langer Fäden. Aërob, verflüssigt Gelatine; Optimum bei Bruttemperatur. Auf erschöpftem Nährboden Sporenbildung; über asporogene Rassen s. o. S. 181.

Rauschbrand (*Bac. Chauvoei*). Befällt Rinder. Anaërob leicht kultivierbar auf den üblichen Medien. Gasbildung. Verflüssigung der Gelatine. Optimum bei Bruttemperatur.

Eitermikrokokken (insbesondere *Staphylococcus pyogenes aureus, St. p. albus*) wachsen auf den üblichen Nährböden, besonders schnell bei Bruttemperatur. Farbstoffproduktion.

Cholera (*Vibrio cholerae*). Wächst auf dem üblichen Nährboden, in Peptonlösung (1 %), auf Kartoffeln. Bei der Choleradiagnose spielt Dieudonnés Blutalkaliagar eine

1) Üb. *Bac. chitinovorus*, einen chitinzersetzenden Spaltpilz (Botan. Zeitg., 1905, I, **63**, 227).

2) Die neuesten Darstellungen des Stoffes im Handbuch der pathog. Mikroorganismen, Jena 1903, **1—4** u. Ergänzungsband (seit 1911 2. Aufl.); kürzer z. B. in Günther, Einführ. in d. Stud. d. Bakteriol., 6. Aufl., Leipzig 1906.

3) Kult. v. path. Bakt. in Düngerstoffen (Zeitschr. f. Hyg. 1906, **52**, 179).

4) Koch, R., Ätiologie d. Milzbrandkrankheit usw. (Cohns Beitr. z. Biol. d. Pfl., 1876, **2**).

große Rolle.[1]) Mischt man defibriniertes Rinderblut zu gleichen Teilen mit n-KOH, so entsteht eine lackfarbige Blutalkalilösung. Nach Sterilisation werden 30 Teile von dieser mit 70 Teilen gewöhnlichem neutralem (Lackmus-)Nähragar gemischt. Choleravibrionen wachsen auf diesem Nährboden trotz seiner starken Alkaleszenz (0,6 % freies Alkali) sehr gut.

Influenza (*Bac. influenzae*). Aërob bei Bruttemperatur auf Blutagar, d. h. solchem, dessen Oberfläche mit frischem Blut (von Menschen, Kaninchen oder besonders von Tauben) bestrichen ist. Über den Einfluß fremder Bakterien auf das Wachstum des Influenzabazillus s. o. S. 177.

Tuberkulose (*Bac. tuberculosis*); seine Isolierung und Kultur auf künstlichen Nährböden (Koch) gehört zu den schwierigeren Aufgaben des Bakteriologen. Man isoliert aus Sputum oder tuberkulösen Organen auf Serum oder Glyzerinserum; zum Überimpfen aus Reinkulturen genügen 6—8 % Glyzerin enthaltender Nähragar, Nährbouillon, Kartoffelnährbouillon[2]) u. a. — Die Tuberkelbazillen wachsen auf Serum sehr langsam, auf Gehirnnährböden schneller; aërob. Optimum 37°.

Typhus (*Bac. typhi*); zu gewinnen aus Milz, Lymphdrüsen usw. frischer Typhusleichen, schwieriger (Begleitung des *Bact. coli*) aus Fäces. Wächst aërob und anaërob bei Zimmertemperatur und besser bei 37° selbst bei schwachsaurer Reaktion des Nährbodens auf Kartoffel, Nähragar, Nährgelatine usw., letztere wird nicht verflüssigt. Über differentialdiagnostische Nährböden s. o. S. 178ff.

Diphtherie (*Bac. diphtheriae*); die Bakterien werden mit sterilem Wattebausch von der verdächtigen Stelle abgehoben und zunächst auf Löfflerschem Blutserum (3 Teile Rinder- oder Hammelserum, 1 Teil neutralisierte Kalbfleischbouillon, 1 % Pepton, 1 % Traubenzucker, 0,5 % NaCl) kultiviert. Das Serum wird bei 100° sterilisiert. Zum Weiterkultivieren des gewonnenen reinen Materials dienen besonders Nähragar und Glyzerinagar.

Gonorrhoe (*Micrococcus gonorrhoeae*). Trippereiter wird in flüssigem Serum wiederholt verdünnt, die endgültige Verdünnung auf 40° erwärmt und mit flüssigem, sterilem Agar gleicher Temperatur vermischt. Auf solchen Blutserumagarplatten entwickeln sich die Kolonien des Gonorrhoekokkus nach ca. 24 Stunden (Wertheimsche Methode). Optimum 37°.

Spirochäten, Syphilis. — Mit den schwer kultivierbaren Spirochäten hat zuerst Mühlens[3]) positive Erfolge erzielt: *Sp. dentium* kann auf einem Pferdeserumagar (2 Teile Agar, 1 Teil Pferdeserum, bei 50° zusammenzugießen und schnell zum Erstarren zu bringen) rein kultiviert werden. Schereschewsky züchtete *Sp. pallida* auf erstarrtem Pferdeserum, indem er kleine Stückchen syphilitischer Gewebe in dieses brachte; allerdings wurden auf diesem Wege nur Mischkulturen gewonnen.[4]) Mühlens[5]) gelang die Trennung, indem er ein kleines Quantum spirochätenhaltiger Flüssigkeit in einem Reagensglas bei 50° in noch flüssiges Pferdeserumagar übertrug und kräftig schüttelte; neben Mischkolonien bildeten sich auch reine Spirochätenkolonien, von welchen die Abimpfung gelang.

---

1) Dieudonné, A., Blutalkaliagar, ein Elektivnährboden für Choleravibrionen (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1909, **50**, 107).

2) Jurewitsch, W., Kartoffelnährbouillon z. Züchtung d. Tuberkelbaz. (Zbl. f. Bakt. I Orig., 1908, **47**, 664).

3) Mühlens, Üb. Züchtung v. Zahnspirochäten u. fusif. Baz. auf künstl. (festen) Nährb. (D. med. Wochenschr. 1906, No. 20).

4) Schereschewsky, J., Züchtung der *Sp. pallida*. Schaudinn (D. med. Wochenschrift 1909, Nr. 19; auch Nr. 29).

5) Mühlens, Klin. Jahrb. 1910, **23**.

Anhang.

Wir haben uns in den vorhergehenden Abschnitten mit den Protozoen und denjenigen Organismengruppen, welche der Botaniker als Thallophyten bezeichnet, beschäftigt. Wenn wir uns auf diese beschränkt haben, so trugen wir dem Sprachgebrauch Rechnung, der im allgemeinen nur Vertreter jener Gruppen als Mikroorganismen gelten läßt. Wir dürfen aber nicht unerwähnt lassen, daß dieselben Methoden, von welchen oben die Rede war, auch außerhalb des bisher behandelten Organismenkreises anwendbar sind oder doch vielleicht anwendbar werden können: die Archegoniaten z. B. (Moose, Farne) liefern uns mit ihren Sporen isolierte Zellen, welche zur künstlichen Kultur nach Mikroorganismenart ohne weiteres geeignet sind. Auf diese und ähnliche Objekte und einige der einschlägigen Fragen will ich im folgenden noch ganz kurz eingehen.

1. **Sporen der Archegoniaten** (Bryophyten, Pteridophyten). — Sporen von Moosen, Filizineen und Equisetazeen lassen sich nicht nur auf Lehm, Torf u. dgl., sondern auch auf künstlichen anorganischen und organischen Nährlösungen, auf Agarmischungen u. dgl. leicht zur Keimung bringen; Laubmoose liefern bei Agarkulturen stattliche beblätterte Pflänzchen.[1])

2. **Pollenkörner.** — Die Mikrosporen der Phanerogamen verhalten sich den soeben genannten Gebilden ähnlich: auch sie keimen leicht auf künstlichen Nährsubstraten. Bei manchen Pflanzen genügt Wasserzufuhr, um die Pollenkörner zur Keimung zu bringen; andere platzen in reinem Wasser und bleiben nur in den Lösungen osmotisch wirksamer Stoffe entwicklungsfähig. Noch andere (Gramineen) keimen nur, wenn die Wasserzufuhr eine ganz geringe ist, und werden am besten auf ein angefeuchtetes Deckglas aufgetragen und in der feuchten Kammer beobachtet. Als empfehlenswertes Kultursubstrat nennt Jost[2]) Agar mit ungefähr 1 % Rohrzucker. — Richtend auf das Wachstum der Pollenschläuche wirken Kohlehydrate (Miyoshi[3]) und Diastase (Lidforss).[4])

3. **Isolierte Zellen höherer Pflanzen und Tiere.** — Bei vielen Thallophyten stellt der spontane Zerfall eines vielzelligen Pflanzenkörpers in seine

---

1) Literatur zitiert Laage, A., Beding. d. Keimung von Farn- und Moossporen (Beih. z. Bot. Zbl. 1907, I, **21**, 76). Vgl. auch Miyoshi, M., Üb. d. Kultur der *Schistostega osmundacea Schimp.* (Botan. Magaz. 1912, **26**, 304).

2) Jost, Zur Phys. des Pollens (Ber. d. D. Bot. Ges. 1905, **33**, 504); Über die Selbststerilität einiger Blüten (Botan. Zeitg. 1907, **65**, 77).

3) Üb. Reizbeweg. d. Pollenschläuche (Flora 1894, **78**, 76).

4) Üb. d. Chemotropismus d. Pollenschläuche (Ber. d. D. Bot. Ges. 1899, **17**, 236).

einzelnen Zellen einen einfachen Vermehrungsmodus dar, der bei höheren Gewächsen gänzlich fehlt. Bei Moosen gelingt es wohl noch, sehr kleine Stückchen eines Thallus (Marchantiazeen) oder die Blättchen, Stammstückchen, Kapseln zur Bildung eines Protonema anzuregen. Bei den Phanerogamen bedarf es stets größerer Abschnitte, wenn Regeneration eintreten soll; einzelne Zellen sind unter günstigen Lebensbedingungen nur zu bescheidenem Wachstum befähigt.[1])

Daß es künftigen Forschungen gelingen wird, Kulturbedingungen ausfindig zu machen, welche isolierten Pflanzenzellen die Wirkungen, die normalerweise von ihrer Nachbarschaft ausgehen, ersetzen und ihnen den Fortgang ihrer normalen Entwicklung möglich machen, ist nicht zu bezweifeln.

Für die Zellen der Tiere scheint dieses Problem der Lösung schon näher zu sein.

Maximow gelang es, auf diesem schwer zugänglichen Forschungsgebiet Resultate zu erzielen. Entzündliche Neubildungen des Bindegewebes ließ er in Fremdkörper einwachsen, welche zur Isolierung der Zellen von ihrem Mutterboden führten und gleichzeitig eine Untersuchung auf dem heizbaren Objekttisch gestatteten — und ferner führte er Fremdkörper in das Versuchstier ein, die geradezu als Nährboden für die Zellen des Bindegewebes wirkten. Versuche der ersten Art wurden mit deckglasähnlichen oder mit dickeren Glasplättchen angestellt, die in geeigneter Weise paarweise miteinander verbunden wurden und zwischen sich einen feinen Spalt für Einwanderung und Verbreitung der Bindegewebszellen frei ließen. Neben den „Glaskammern“ kamen „Zelloidinkammern“ zur Verwendung, kleine, aus dem käuflichen, knorpeligen Zelloidin geschnittene Blöckchen von 8 : 4 : 2 (oder 3) mm, die ½ Stunde in physiologischer Kochsalzlösung gekocht wurden; mit dem Rasiermesser wurden parallel zur größten Fläche der Stückchen zwei nicht völlig durchgehende Schnitte gemacht; in diese Spalte traten später die Bindegewebszellen ein. Außerdem fertigte Maximow Zelloidinröhrchen von ca. 7 mm Länge an, indem er eine Stahlnadel oder dgl. wiederholt in Zelloidinlösung eintauchte und das Zelloidin an ihr trocknen ließ. Diese Röhrchen wurden bei einigen Versuchen (durch Eintauchen) mit geschmolzenem Fleischpeptonagar gefüllt. In solchen Zelloidinkammern sah Maximow manchmal „echte Reinkulturen von gewissen Zellarten“ sich bilden. „Selbstverständlich sind die Veränderungen, welche die verschiedenen, als isolierte selbständige Elemente in den Fremdkörper einwandernden Zellen durchmachen, nicht identisch mit denjenigen, welche sie im Gewebe selbst bei der Entzündung und Narbenbildung erleiden. Im Innern des Fremdkörpers sind die Elemente frei geworden von den ihre Entwicklung beeinflussenden und oft hemmenden Wirkungen der Nachbarzellen; sie entfalten hier, wo

1) Haberlandt, Kulturversuche mit isol. Pflanzenzellen (Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien 1902, I, **111**, 69).

sie, wie z. B. in den Agarkammern, von reichlichem Nährmaterial umgeben sind, ungestört die ihnen innewohnenden Fähigkeiten zur progressiven Entwicklung, hypertrophieren, erreichen manchmal ganz außerordentliche Größen und können sich sogar vermehren"[1]) (a. a. O. S. 242).

Nachdem es schon HARRISON gelungen war, Gewebe des Froschembryos in Lymphe zu züchten[2]), haben neuerdings BURROWS, CARREL und deren Mitarbeiter[3]) sich eingehend mit der Kultur tierischer und menschlicher Gewebe beschäftigt: als Kulturmedien dienen Blutplasma der betreffenden Tierspezies — rein oder mit Zusatz von 0,1 % oxalsaurem Natrium, verdünntes Plasma (1 : 2 Wasser), Plasmaagar, RINGERsche Lösung[4]); normale und pathologische Gewebe wurden bereits in vitro zum Wachsen gebracht. —

Von besonderem Interesse ist die Frage, ob auch isolierte, d. s. vom andern Geschlecht dauernd getrennte Sexualzellen „kultiviert", d. h. am Leben erhalten und zur Teilung gebracht werden können. Über die Befähigung der Eier vieler Tiere, unter bestimmten Kulturbedingungen zu Embryonen sich entwickeln zu können („künstliche Parthenogenese"), existiert bereits eine umfangreiche Literatur, deren Inhalt schon wiederholt zusammenfassend dargestellt worden ist; die Samenzellen haben bisher einer ähnlichen „Kultur" unüberwindliche Schwierigkeiten entgegengestellt. Vielleicht bedeuten die von LOEB und BANCROFT erzielten Erfolge[5]) einen ersten Schritt zur Lösung dieser Frage: die genannten Forscher übertrugen lebende Spermatozoën von Vögeln in Eigelb, Eiweiß, Hühnerserum oder RINGERsche Lösung ($^1/_6$ bis $^1/_{10}$ Normal) und sahen namentlich an dem Kopf der Spermatozoën auffallende Veränderungen sich abspielen.

4. **Höhere Pflanzen und intakte Individuen** in vitro zu kultivieren, gelang verschiedenen Autoren. HANNIG[6]) arbeitete mit herauspräparierten

1) Experimentelle Unters. üb. d. entzündliche Neubildung von Bindegewebe (5. Supplementheft d. Beitr. z. pathol. Anat. usw., Jena 1902).

2) HARRISON, R. GR., Outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic mouvement. (Journ. exp. zool. 1910, **9**).

3) Vgl. z. B. CARREL, A., Die Kultur der Gewebe außerhalb des Organismus (Berl. Klin. Wochenschr. 1911, 1364); CARREL, A. u. BURROWS, M. T., Cultiv. of tissues in vitro and its technique (Journ. exp. med. 1911, **13**, No. 3); INGEBRITSEN, R., Infl. of heat on different sera as culture media for growing tissues (ibid. 1912, **15**, 397); CARREL, A., On the permanent life of tissues outside of the organism (ibid. 1912, **15**, 516); WEIL, G. C., Some observ. on the cultivation of tissues in vitro (Journ. med. research 1912, **26**, 159) u. v. a. Die jüngste Behandlung des Themas bei CARREL, Neue Meth. z. Stud. des Weiterlebens v. Gew. in vitro (ABDERHALDEN's Handb. d. biochem. Meth. 1912, **6**, 519).

4) Diese ist nach folgendem Rezept herzustellen:

H_2O	100	g
NaCl	0,6	„
$NaHCO_3$	0,01	„
$CaCl_2$	0,01	„
KCl	0,0075	„

5) LOEB, J. u. BANCROFT, F. W. (Journ. exp. zool. 1912, **12**, 381).

6) HANNIG, E., Zur Phys. pflanzl. Embr. (Bot. Zeitg. 1904, 45).

Embryonen von Kruziferen, die er in mit Embryosacksaft gefüllten Glasröhrchen heranwachsen ließ; auch Lösungen von bekannter Zusammensetzung (Asparagin, Leuzin, Zucker usw.) erwiesen sich als geeignet. Als fester Nährboden diente z. B.

Gelatine	10 %
Rohrzucker	10 %
Asparagin	0,01 %,

hierzu Mineralsalze.

Daß es gelingen könnte, isolierte Ovula höherer Pflanzen in geeigneten Nährlösungen am Leben zu erhalten und gleichzeitig ausgesäte Pollenkörner unter dem Mikroskop keimen und die Schläuche mit den Samenanlagen in Beziehung treten zu lassen, erscheint keineswegs ausgeschlossen. Nach van Tieghems Angaben sind ihm solche Versuche tatsächlich bereits gelungen; neuere Untersuchungen hierüber liegen leider nicht vor.[1])

Keimlinge und Pflanzen in vorgerückten Stadien der Entwicklung kultivierte z. B. Molliard.[2]) Schmidt bediente sich hierzu der Gasglühlichtzylinder als Kulturgefäße: an einer Seite werden die Röhren mit einer Kollodiumschicht geschlossen (Aufgießen über Hg); dann werden sie mit Sand gefüllt und in ein ebenso gefülltes Becherglas eingestellt. Nach Sterilisation und Beimpfung werden die Röhren mit Watte verschlossen. Das Aufgießen von neuer Nährlösung erfolgt durch das Becherglas; die Kollodiumschicht dient als Bakterienfilter.[3])

Kleine lebende Pflanzen sterilisierten Mamelli und Pollacci[4]) mit H_2O_2 (2,4 % 5—15 Minuten). Tubeuf sterilisierte Samen von *Cuscuta* durch Schütteln in 1%iger Sublimatlösung oder 96%igem Alkohol und nachfolgendes Abwaschen mit sterilisiertem Wasser (1912 a. a. O.)

Wenn der Züchter mit „reinen Linien“ arbeitet, d. h. seine Versuche mit Individuen anstellt, die sämtlich Nachkommen eines absolut selbstbefruchtenden homogygotischen Exemplares darstellen, so sind seine Objekte untereinander in ganz ähnlichem Sinne vergleichbar wie die durch „Einzellkultur“ gewonnenen Mikroben irgendeiner Kolonie.

Das lebende Substrat, auf das in der Natur die Parasiten Anspruch machen, läßt sich im Versuch durch totes Material ersetzen. Molliard kultivierte *Cuscuta monogyna* monatelang auf organischen Nährmedien. Die

1) van Tieghem, Ann. sc. nat. Bot. sér. V 1869, **12**, 323; vgl. hierzu Strasburger, Über Befruchtung und Zellteilung, Jena 1877, 53, 54.

2) Molliard, M., Action morphog. de quelques subst. organ. etc. (Rev. gen. de Bot., 1907, **19**, 241).

3) Schmidt, E. W., Zur Methodik v. Infektionsversuchen an höheren Pfl. (Zbl. f. Bakt. II, 1910, **25**, 426); ebendort ein Verfahren, höhere Pflanzen auf Knop-Agar steril zu erziehen. Vgl. ferner Petri, L., Nodositätenbildung auf d. Rebenwurzeln durch die Reblaus in sterilis. Mittel (ibid. 1909, **24**, 146).

4) Mamelli, E. e Pollacci, G., Metodo di sterilisazione di piante vive per esperienze di patologia e di fisiologia (Rendic. Accad. Lincei 1910, **19**, 569).

Samen wurden auf feuchter Watte zum Keimen gebracht und dann in mineralischer Nährlösung + 5 — 10% Glukose weiterkultiviert. Bei Kultur in 5% Glukose + 1% Pepton (oder Asparagin) erschienen sogar (ohne Kontaktreiz) Haustorien[1]). Versuche mit *Cuscuta glomerata* stellte TUBEUF an[2]). Derselbe Forscher kultivierte *Viscum album* und *V. cruciatum* mehrere Jahre hindurch auf Agarböden und andern Medien. Einen zusammenfassenden Bericht über die Sterilisation lebender Pflanzen hat GRAFE[3]) unlängst gegeben. —

Daß auch Metazoën als intakte Organismen nach Art der Mikroben sich kultivieren lassen, lehrt das Wachstum der Aelchen auf Agar. Die Kultur der Hydatinen *(Hydatina senta)*, Polypen (*Hydra* u. a.), wie sie zu tierphysiologischen Zwecken betrieben wird, steht der Aquariumtechnik wohl näher als den Züchtungsverfahren des Mikrobiologen.

---

1) Cultures saprophytiques de *Cuscuta monogyna* (C. R. Acad. Sc. Paris 1908, **147**, 685).

2) v. TUBEUF, Versuche mit Mistelreinkulturen in Erlenmeyerkölbchen (Naturwiss. Ztschr. f. Forst- u. Landwirtsch. 1912, **10**, 138).

3) GRAFE, V., Das Sterilis. lebender Pfl. (ABDERHALDEN's Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. 1912, **6**, 139).

Nachträge.

Folgende Arbeiten, mit welchen ich während der Drucklegung des Buches bekannt wurde, konnte ich leider nicht mehr im Texte berücksichtigen; im Sachregister konnten Hinweise auf ihren Inhalt noch aufgenommen werden.

Baerthlein, Über Mutationserscheinungen bei Bakterien (Arb. Kais. Gesundheits-Amt 1912, **40**, 433).

Beyerinck, M. W., Mutation bei Mikroben (Folia microbiol. 1912, **1**, 4—100).

Bertrand, G., Sur l'extraordinaire sensibilité de l'*Aspergillus niger* vis-à-vis du manganèse. — Sur le rôle capital du manganèse dans la production des conidies de l'*Asp. nig.* (Ann. Inst. Pasteur 1912, **26**, 767).

Bodin, E. A., Recherches sur les poisons produits par l'*Aspergillus fumigatus* (Ann. Inst. Pasteur 1912, **26**, 371). — Über die in den Nährlösungen enthaltenen toxischen Stoffwechselprodukte, ihre Wirkung auf Tiere u. a.

Boeseken, J. und Waterman, H., Über eine biochemische Methode zur Bestimmung kleiner Mengen von Salizylsäure bei Gegenwart eines Überschusses von p-Oxybenzoësäure (Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam 1911): eine neue Methode zur biochemischen Analyse. In anderen Arbeiten derselben Autoren (a. a. O. 1911) wertvolle Beiträge zur Kenntnis der Giftwirkungen und der Kohlenstoffphysiologie der Schimmelpilze. Vgl. auch Boeseken, J., und Waterman, H., Über die Wirkungen der Borsäure und einiger anderer Verbindungen auf die Entwicklung von *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger* (Fol. microbiol. 1912, **1**, 342).

Combes, R., Sur les lignes verticales dessinées par le *Chlorella vulgaris* contre les parois des flacons de culture (Bull. Soc. bot. France 1912, **59**): über Wachstum der Alge in Rein- und in Mischkulturen.

Cool, C., Beiträge zur Kenntnis der Sporenkeimung und Reinkultur der höheren Pilze (Zbl. f. Bakt. II, 1912, **35**, 481). — Bericht über zahlreiche Reinkulturen von Asko- und Basidiomyzeten; die Sporen fast aller holzbewohnenden Pilze konnten zur Keimung gebracht werden.

Keil, Fr., Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1912, **11**, 335).

Kellerman, K. F., a. Mc Beth, J. G., The fermentation of cellulose (Zbl. f. Bakt. II, 1912, **34**, 485); Rezept für Herstellung eines Zelluloseagars u. a.

Klöcker, A., Unters. über einige neue *Pichia*-Arten (Zbl. f. Bakt. II 1912, **35**, 369).

Lindner, P., Unterschiedliches Verhalten eines + und — Stammes von *Phycomyces nitens* gegenüber verschiedenen Zuckerarten (Zbl. f. Bakt. II 1912, **35**, 304).

Munk, M., Über die Bedingungen der Koremienbildung bei *Penicillium* (Mykol. Zbl. 1912, **1**, 387); die Koremiumbildung (vgl. oben S. 126, 151) ist vermutlich als formative Wirkung bestimmter Stoffwechselprodukte zu betrachten.

Raybaud, L., Influence du milieu sur les champignons inférieurs (Rev. gén. de bot. 1912, **24**, 392).

Schnell, E., Die auf Produkten der Landwirtschaft und der landwirtschaftlichen Gewerbe vorkommenden *Oospora* (*Oidium*) *lactis*-Varietäten (Zbl. f. Bakt. II 1912, **35**, 1).

Sartory, A., Sporulation d'une levure sous l'influence d'une bactérie (C. R. Soc. Biol. 1912, **72**); die Hefe (Varietät von *Willia Saturnus*) konnte nur in Mischkultur mit einem in ihrer Gesellschaft gefundenen Bazillus zur Sporenbildung gebracht werden.

Schkorbaton, L., Zur Morphologie und Farbstoffbildung bei einem neuen Hyphomyzeten (*Gemmophora purpurascens n. gen. et sp.*) (Ber. d. D. Bot. Ges. 1912, **30**, 474).

Thaysen, A. C., Funktionelle Anpassung bei Bakterien (Zbl. f. Bakt. I Orig. 1912, **67**, 1).

Sachregister.

Druck von B. G. Teubner in Dresden.



